



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA

**PESTICIDE RESIDUES IN HONEY AND BEESWAX: DEVELOPMENT
AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS**

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL E CERA DE ABELHAS:
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

CAMPINAS

2020

ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA

**PESTICIDE RESIDUES IN HONEY AND BEESWAX: DEVELOPMENT
AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS**

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL E CERA DE ABELHAS:
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Thesis presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor, in the area of Food Science.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr Felix Guillermo Reyes Reyes
Co-orientadora: Dra. Nadia Regina Rodrigues

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. FELIX
GUILLERMO REYES REYES

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

So89r Souza, Ana Paula Ferreira de, 1987-
Resíduos de agrotóxicos em mel e cera de abelhas : desenvolvimento e validação de métodos analíticos / Ana Paula Ferreira de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes.

Coorientador: Nadia Regina Rodrigues.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Mel. 2. Cera de abelha. 3. Agrotóxicos. 4. Método analítico. I. Reyes, Felix Guillermo Reyes. II. Rodrigues, Nadia Regina. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pesticide residues in honey and beeswax : development and validation of analytical methods

Palavras-chave em inglês:

Honey

Beeswax

Pesticides

Analytical method

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Felix Guillermo Reyes Reyes [Orientador]

Claudia Helena Pastor Ciscato

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Lionel Segui Gonçalves

Data de defesa: 21-10-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7870-4409>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9804675058870120>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
Orientador

Dra. Claudia Helena Pastor Ciscato
Instituto Biológico de São Paulo

Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz
EMBRAPA – Meio Ambiente

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
UfSCar – Araras

Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves
UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi-Árido

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Sr. José e Dona Maria pelo
incentivo aos estudos desde pequena e
incondicional apoio.*

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, por me proporcionar a oportunidade da realização da graduação ao doutorado;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo apoio institucional;

Ao Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes pela disponibilidade na orientação deste trabalho e aprendizado ao longo dos últimos anos;

À Dra. Nadia Regina Rodrigues pela co-orientação neste trabalho, incentivo e amizade ao longo de minha carreira profissional e acadêmica;

Ao prof. Dr. Amadeo Fernandez-Alba, Dra. Carmen Ferrer e ao grupo de Investigação AGR 159 “Residuos de Plaguicidas” Junta de Andalusia, Universidade de Almeria, em Almería-Espanha pela acolhida para o desenvolvimento de parte desta tese;

À família Colomera (Ana Maria e Emilio) por me receber em sua casa como uma filha. Foram momentos maravilhosos proporcionados em nossos passeios (“senderismo”) pela Andalusia aos fins de semana. À Emilio em especial por compartilhar sua história de vida e por preparar a melhor “Paella”. À Ana Maria por seu ativismo para uma sociedade melhor frente à Associação de Bairro “Las Palmeras”;

Aos amigos e colegas do CPQBA e da Divisão de Química Analítica.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia pela amizade e companheirismo em especial à Patricia Braga pelos ensinamentos técnicos e da vida. À Mateus Henrique Petrarca pela parceria no laboratório;

Ao Diego Silva, pelo apoio e paciência não só neste momento, mas na vida;

Aos professores dos cursos de Pós-Graduação da FEA e do Instituto de Química (IQ) com os quais tive oportunidade de cursar disciplinas;

Aos membros da Banca Examinadora pela disponibilidade, correções e sugestões.

RESUMO

A contaminação por agrotóxicos de diferentes grupos químicos e diferentes classes provocam alterações no desenvolvimento do sistema imunológico e do sistema nervoso de abelhas, afetando a polinização. No Brasil, um dos maiores produtores agrícolas mundiais, colmeias de abelhas vêm sendo perdidas devido ao manejo equivocado de agrotóxicos. O mel e a cera de abelhas podem ser utilizados como indicadores ambientais desse tipo de contaminação. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos no mel e cera de abelhas, utilizando técnicas de cromatografia líquida e cromatografia gasosa, acopladas a sistemas de detecção por espectrometria de massas e por fluorescência. A técnica de extração QuEChERS foi aplicada em amostras de cera brasileira e as mesmas foram analisadas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS/MS). Foram investigados 160 agrotóxicos e, das 19 amostras de ceras, 90% apresentaram um ou mais agrotóxicos. A estimativa do risco de exposição, calculada através do quociente de risco e dose letal (DL_{50}), indicou um risco elevado para as abelhas devido à presença de clorpirifós e permetrina. Já na identificação e quantificação do herbicida glifosato e seu metabólito [ácido aminometilfosfônico (AMPA)] em amostras de mel, foi possível, através da técnica de cromatografia líquida acoplada ao detector específico de fluorescência, atingir níveis de LOQ de $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$, permitindo uma quantificação com exatidão e precisão necessárias. De 40 amostras de mel brasileiro, 06 apresentaram resíduos acima do limite máximo de resíduos (LMR) aceitáveis para essa matriz na Comunidade Europeia ($50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Por fim, no desenvolvimento de um método para a identificação dos inseticidas clorpirifós, dimetoato, imidacloprido, clotianidina, permetrina e cipermetrina em mel através da técnica cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, foi aplicada a abordagem de Plackett-Burman para otimizar o preparo de amostras baseado em QuEChERS e d-SPE, economizando tempo e solventes. Este método foi então aplicado a 51 amostras de mel do Brasil e exterior, sendo que uma amostra apresentou resíduos em níveis de $102 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de cipermetrina, acima do LMR permitido. Os resultados obtidos demonstram a importância do monitoramento de agrotóxicos e a necessidade de novas práticas agrícolas e apícolas para a manutenção das colmeias e dos insetos polinizadores.

Palavras-chave: mel. cera de abelhas. agrotóxicos. métodos analíticos.

ABSTRACT

Contamination by pesticides from different chemical groups and different classes causes changes in the development of the immune system and of the nervous system of bees, affecting pollination. In Brazil, one of the largest agricultural producers in the world, beehives have been lost due to the mismanagement of pesticides. Honey and beeswax can be used as environmental indicators of this type of contamination. The present work aimed to develop and validation of analytical methods for the determination of pesticide residues in honey and beeswax, using liquid chromatography and gas chromatography techniques, coupled to mass spectrometry and fluorescence detection systems. The QuEChERS extraction technique was applied in Brazilian wax samples, and they were analyzed by gas chromatography with mass spectrometry (GC - MS/MS). A total of 160 pesticides were investigated and, of the 19 wax samples, 90% presented one or more pesticides. The exposure risk estimate calculated using the hazard quotient and lethal dose (DL_{50}), indicated a high risk to the bees due to the presence of chlorpyrifos and permethrin. In the identification and quantitation of the herbicide glyphosate and its metabolite [aminomethylphosphonic acid (AMPA)] in honey samples, it was possible, through the liquid chromatography technique coupled to the specific fluorescence detector, to reach LOQ levels of 0.04 mg kg^{-1} allowing an accurate quantitation and precision needed. Of 40 Brazilian honey samples, 06 showed residues above the permitted maximum residue limit (MRL) for honey in the European Community ($50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Still, in the development of the method for the identification of the chlorpyrifos, dimethoate, imidacloprid, clothianidin, permethrin, and cypermethrin insecticides in honey by liquid chromatography with mass spectrometry, the Plackett-Burman approach was applied to optimize sample preparation based on QuEChERS and d-SPE saving time and solvents. This method was applied to 51 honey samples from Brazil and other countries in which one sample showed residues at levels of $102 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ of cypermethrin above the MRL. The results obtained demonstrate the importance of monitoring pesticides and the need for new agricultural and beekeeping practices for the maintenance of beehives and pollinating insects.

Keywords: honey. beeswax. pesticides. analytical methods.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01

Figura	Conteúdo	Página
1	Evolução da produção de mel no Brasil.	23
2	Uso de agrotóxico dividido pela área total cultivada.	29
3	Distribuição do consumo de agrotóxicos por região brasileira no ano de 2017, em toneladas de ingredientes ativos (I.A.).	30
4	Agrotóxicos detectados em diferentes estudos e/ou relatados como danosos a insetos polinizadores.	34
5	Esquema do método Luke para análise multirresíduos em alimentos.	40
6	Esquema do método original QuEChERS para análise multirresíduos em alimentos.	41

CAPÍTULO 02

Figura	Conteúdo	Página
1	Representative Extracted Ion Chromatograms (EIC) obtained from beeswax samples contaminated with chlorpyrifos (SRM 1: 314>258; SRM 2: 314>286; ion ratio 99.7%), diazinon (SRM 1: 137>84; SRM 2: 304>179; ion ratio 92.8%) and permethrin (SRM 1: 163>127; SRM 2: 183> 153; ion ratio 126.3%) residues.	72
2	Contribution to the hazard quotient (HQ) of each pesticide quantitated in Brazilian beeswax.	74

CAPÍTULO 03

Figura	Conteúdo	Página
1	Distribution of sampling points in the Brazilian States. (1: Piauí; 2: Minas Gerais; 3: São Paulo; 4: Paraná; 5: Santa Catarina; 6: Rio Grande do Sul).	91
2	Representative chromatograms of (A) Blank honey sample; (B) Spiked blank sample at 0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$; (C) Analytical standard in solvent at concentration of 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; (D) Analyzed sample.	96

CAPÍTULO 04

Figura	Conteúdo	Página
1	Representative chromatograms in a honey extract at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for clothianidin, imidacloprid, dimethoate, chlorpyrifos, cypermethrin and permethrin.	124
2	Distribution of insecticide residues in analyzed honey samples purchased commercially.	132
3	Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatogram obtained from a honey sample from Spain contaminated with cypermethrin at 102 $\mu\text{g kg}^{-1}$.	133

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01

Tabela	Conteúdo	Página
1	Classificação dos agrotóxicos relacionada à toxicidade aguda.	26
2	Classificação dos agrotóxicos quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA).	27
3	Ranking dos 10 princípios ativos mais comercializados no país.	29
4	Ocorrência e níveis de agrotóxicos em produtos apícolas.	35
5	Plano de amostragem e alguns limites de referência adotados no PNCRC/Mel no ano de 2019.	38
6	Métodos de extração, limpeza e quantificação de agrotóxicos em produtos apícolas.	44

CAPÍTULO 02

Tabela	Conteúdo	Página
1	List of pesticides evaluated in this study and mass spectrometric conditions for the GC-MS/MS analysis.	69
2	Table 02. Summary of pesticide (insecticide) residues in Brazilian beeswax.	73

CAPÍTULO 03

Tabela	Conteúdo	Página
1	Validation parameters of the analytical method for honey.	97
2	Glyphosate (GLY) residue levels in Brazilian honey according to the botanical origin.	98
3	Glyphosate (GLY) residue levels in honey from different countries.	99

CAPÍTULO 04

Tabela	Conteúdo	Página
1	Selected reaction monitoring (SRM) settings for the targeted insecticides using electrospray ionization (ESI) source in positive ionization mode.	119
2	Main effects of evaluated parameters on the recovery (%) of insecticides estimated according the Plackett-Burman design.	126
3	Maximum residue limits (MRL) and validation data of the analytical method for the determination of insecticide residues in honey.	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviaturas e siglas	Nome por extenso
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COLOSS	prevention of honey bee COlony LOSSes
CV	coeficiente de variação
C18	octadecil
CCD	<i>colony collapse disorder</i>
EC	<i>European Community</i>
ECD	<i>electron capture detector</i>
ESI	<i>eletrospray source ionization</i>
EI	<i>electron ionization</i>
EU	<i>European Union</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GC	<i>gas chromatography</i>
G	gramas
RCF	<i>relative centrifugal force</i>
FLD	<i>fluorescence detector</i>
GHS	<i>Global Harmonization System</i>
HQ	<i>hazard quotient</i>
HES	<i>high efficiency source</i>
I.A.	ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	ingestão diária aceitável
JMPR	<i>Joint Meeting on Pesticide Residues</i>
kg	quilograma
LC	<i>liquid chromatography</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LD ₅₀	<i>lethal dose</i>
LMR	limite máximo de resíduos
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama

mL	mililitro
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MRL	<i>maximum residue limit</i>
MgSO ₄	sulfato de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
N ₂	gás nitrogênio
NPD	<i>nitrogen phosphorous detector</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
pH	potencial hidrogeniônico
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	<i>primary secondary amine</i>
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>
PTFE	<i>polytetrafluorethylene</i>
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
TFA	trifluoroacetic acid
Unesp	Universidade Estadual Paulista
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
µg	micrograma
µL	microlitro
CH ₃ CN	acetonitrila
CH ₃ COOC ₂ H ₅	acetato de etila

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
Problemática	15
Objetivos e metas	16
CAPÍTULO 01. REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 Atividade apícola, polinização e problemática das abelhas	19
1.2 Produtos apícolas estudados	21
1.2.1 Mel	21
1.2.2 Cera	23
1.3 Agrotóxicos	25
1.3.1 Mercado brasileiro de agrotóxicos	28
1.3.2 Toxicidade para abelhas e ocorrências em produtos apícolas	30
1.3.3 Limites máximos de resíduos e programa de monitoramento	37
1.4 Métodos de análise para determinação de agrotóxicos	38
CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 02. MULTIRESIDUE METHOD FOR THE ANALYSIS OF MULTICLASS PESTICIDES IN BRAZILIAN BEESWAX BY GAS CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY AND PESTICIDE HAZARD EVALUATION	59
Abstract	61
Introduction	62
Material and Methods	64
Results	70
Discussion	74
Conclusion	77
Acknowledgments	77
Disclosure statement	78
Funding	78
References	78
CAPÍTULO 03. GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID (AMPA) RESIDUES IN BRAZILIAN HONEY	83
Abstract	85
Introduction	86
Material and Methods	89
Results and Discussion	94
Acknowledgments	100
Disclosure statement	100
Funding	100
References	101
Supplemental online material	109
CAPÍTULO 04. OCCURRENCE OF INSECTICIDES RESIDUES IN HONEY BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY	111
Abstract	113

Introduction	115
Material and Methods	116
Results and Discussion.....	123
Conclusion.....	135
Acknowledgments.....	135
Disclosure statement	135
Funding.....	135
References	137
Supplemental online material	140
DISCUSSÃO GERAL	147
CONCLUSÃO GERAL.....	151
REFERÊNCIAS.....	153
ANEXO I - APLICAÇÃO DE MÉTODO MULTIRESSÍDUOS PARA ANÁLISES DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM AMOSTRAS DE MEL DO MERCADO BRASILEIRO	170

INTRODUÇÃO

Problemática

A poluição ambiental é um problema crescente no mundo moderno, especialmente quando se trata de agrotóxicos. O cultivo em larga escala de monoculturas é frequentemente acompanhado pelo aumento do uso de agrotóxicos, sendo esses, em parte, responsáveis pela diminuição da população de insetos polinizadores, em especial das abelhas, interferindo na polinização das plantas. Um fenômeno conhecido como distúrbio do colapso das colônias (DCC), caracterizado pela diminuição rápida e inexplicada da população de abelhas adultas de uma colmeia, tem sido relatado principalmente em países do hemisfério norte, como Estados Unidos, no continente europeu e na América do Sul, inclusive no Brasil, como constatado por Message (2010) e Gonçalves & Castilhos (2015). É ocasionado por uma série de fatores, dentre eles uso de agrotóxicos no entorno das colmeias e a presença do ácaro *Varroa destructor* (NOVAIS *et al.*, 2016; CASTILHOS *et al.*, 2019a; BRADBPEAR, 2009).

A prática agrícola contribui para a exposição das abelhas a uma grande variedade de agrotóxicos durante o seu forrageamento, principalmente agrotóxicos sistêmicos, haja vista que as abelhas percorrem cerca de 6 km² em busca de alimento. Os resíduos desses contaminantes podem chegar ao néctar e pólen pelo ar, água, plantas e solo e depois serem transportados para a colmeia pelas abelhas. Já a prática apícola pode ocasionar a exposição direta das abelhas, pois são aplicados diretamente na colmeia agrotóxicos para o tratamento de vírus, fungos e bactérias que podem acometer a saúde da colmeia (BREED, 2010; BOGDANOV, 2006). No Brasil, atualmente, não há nenhum produto autorizado para o tratamento direto de colmeias.

Na abelha, a contaminação por agrotóxicos de diferentes grupos químicos (neonicotinoides, organofosforados, carbamatos) de diferentes classes (inseticidas e herbicidas, entre outras) provocam, em doses subletais, alterações no desenvolvimento, no sistema imunológico e no sistema nervoso, e também podem acarretar na presença de resíduos desses agrotóxicos nos produtos apícolas comercializados posteriormente (NOVAIS *et al.*, 2016; HERBERT *et al.*, 2014; SIMON DELSO *et al.*, 2015; SANTOS M.A.T. *et al.*, 2007; RISSATO *et al.*, 2007).

Cabe ressaltar a importância desses insetos polinizadores no desafio de garantir a segurança alimentar e nutricional, tendo em vista o crescimento populacional e a demanda por

alimentos, sendo que 75% dos alimentos produzidos dependem de alguma maneira da polinização (FAO, 2017; PINHEIRO & FREITAS, 2010).

Métodos analíticos para a detecção e quantificação de resíduos de agrotóxicos são indispensáveis para a obtenção de dados que ajudarão para a implantação de novas políticas de Boas Práticas Agrícolas e Apícolas de maneira a proteger a saúde humana e animal, além do meio ambiente e ecossistema, do uso de agrotóxicos (LEHOTAY, 2018).

Objetivos e metas

Dada a importância das colmeias de abelhas para a manutenção do equilíbrio ecológico, da biodiversidade e da produção de alimentos, e ainda considerando os produtos apícolas como indicadores de contaminação ambiental este trabalho de doutorado foi desenvolvido para disponibilizar métodos analíticos empregando técnicas cromatográficas a fim de se determinar tais resíduos em dois produtos apícolas: mel e cera de abelhas.

O trabalho envolveu aspectos que incluíram desenvolvimento de preparo de amostras, instrumentação analítica e análises estatísticas, o que proporcionou interações interdisciplinares com pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento. Neste estudo, foi então determinada, em amostras de mel, a presença de resíduos de alguns dos principais inseticidas utilizados no país pertencentes às classes dos neonicotinoides (imidacloprido e clotianidina), organofosforados (clorpirifós e dimetoato), piretroides (cipermetrina e permetrina) e o herbicida glifosato. Já para determinar a presença de resíduos de agrotóxicos em ceras de abelhas, foi utilizado um método multirresíduos tendo sido realizada a estimativa do quociente de risco para abelhas expostas a ceras contaminadas.

Para atingir o objetivo proposto, o projeto seguiu as seguintes metas:

- Desenvolvimento e otimização do método de preparo de amostras (extração e *cleanup*) para a determinação de resíduos de agrotóxicos no mel, utilizando diferentes técnicas analíticas (LC-MS/MS e HPLC-FLD);
- Desenvolvimento e otimização das condições analíticas para a identificação e quantificação de resíduos de diferentes classes de agrotóxicos em mel, por LC-MS/MS e HPLC-FLD;
- Validação dos métodos analíticos desenvolvidos, utilizando como referência a diretiva SANTE 11813/2017;

- Aplicação dos métodos validados na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel obtidas no mercado interno/externo;
- Aplicação de método de preparo de amostra (QuEChERS) e da técnica analítica GC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de ceras brasileiras;
- Estimativa do quociente de risco atrelado à contaminação da cera de abelha e sua disposição na colmeia.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DA LITERATURA

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Atividade apícola, polinização e problemática das abelhas

A FAO/ONU (*Food Agriculture Organization of the United Nations*) define a apicultura como o manejo de abelhas em colmeias. Considera-se que a prática apícola abrange os objetivos de desenvolvimento sustentável, contribuindo para a diminuição da pobreza, fome zero, boa saúde e bem-estar, trabalho decente e crescimento econômico, além de consumo e produção responsáveis (FAO, 2019).

A introdução de abelhas *Apis mellifera* no cenário brasileiro ocorreu ainda no século XVIII, porém, após o geneticista Warwick Estevam Kerr introduzir a subespécie *Apis mellifera scutellata* e, posteriormente, realizar o cruzamento com subespécie europeia, na década de 1950, é que se obteve uma abelha produtiva e resistente (conhecida como abelha africanizada) (COLMEIA VIVA, 2017).

A atividade apícola expandiu-se a partir da década de 1970, ganhando ares comerciais a partir do início dos anos 2000 e está presente em todos os estados brasileiros. No Brasil é predominantemente desenvolvida de forma fixa, sendo menos frequente o aluguel de colmeias em campos de culturas a exemplo do que ocorre nos EUA (BALBINO *et al.*, 2015). De acordo com Censo Agropecuário realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2017, o país contava com mais de 100 mil estabelecimentos agropecuários com atividade apícola e mais de 2 milhões de caixas de abelhas (IBGE, 2018).

Os insetos polinizadores têm importante papel no desafio em garantir a segurança alimentar e nutricional, tendo em vista o crescimento populacional, estimado em 9,8 bilhões de habitantes até 2050, e consequente demanda por alimentos (FAO, 2017). As abelhas possuem uma relação muito estreita com as plantas favorecendo o cultivo e qualidade dos alimentos produzidos sendo os mais importantes polinizadores na natureza. Uma abelha forrageira faz em média 10 viagens diárias e explora aproximadamente 6 km² em torno de sua colmeia em busca de alimento, como néctar, água e pólen, exercendo assim a atividade polinizadora e ainda oferecendo outros recursos como resinas e óleos (BREED, 2010).

Cerca de 75% dos alimentos produzidos mundialmente provém da polinização por insetos, principalmente abelhas. Dentre os principais alimentos, o pepino, o figo, o melão e o mamão são dependentes exclusivamente da polinização para seu cultivo. Já o café, feijão, laranja, soja, e tomate são exemplos de alimentos que são beneficiados pela polinização das abelhas (PINHEIRO & FREITAS, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2003). No Brasil, as abelhas

formam o maior grupo de polinizadores identificadas como visitantes florais de cultivos vinculados à produção de alimentos. A *Apis mellifera* está associada a 86 cultivos, sendo potencial polinizadora de 54 deles (BPBES, 2019).

Giannini *et al.* (2015) estimaram o valor econômico associado à polinização em culturas brasileiras. Através do cruzamento de dados sobre o valor econômico da produção agrícola e a taxa de dependência da cultura em relação à polinização, chegaram a uma contribuição total dos polinizadores equivalente a US\$ 12 bilhões. Nesse estudo, os maiores valores obtidos foram para soja (US\$ 5,7 bilhões), café (US\$ 1,9 bilhões) e tomate (US\$ 992 milhões). Em estudo semelhante, Novais *et al.* (2016) determinaram um valor monetário médio por área até três vezes maior das culturas dependentes da polinização em relação às não dependentes (na casa dos US\$ 42 bilhões). Tais estudos sempre levam em consideração apenas culturas das quais existam dados como produção, área plantada e valor econômico para a realização dos cálculos, não mencionando as consideradas *minor crops*, que também são passíveis dos efeitos benéficos da polinização (como açaí, castanha-do-brasil e cupuaçu).

Nas últimas décadas, um aumento na perda de colmeias foi relatado em diferentes países e devidos à suas características foi denominado fenômeno chamado de distúrbio do colapso das colônias de abelhas (DCC). Tal distúrbio é caracterizado pelo desaparecimento repentino das abelhas operárias ou pela redução, em poucos dias, do tamanho da colmeia, morte da colmeia com excesso de crias ou ainda ausência de crias (PIRES *et al.*, 2016; EMBRAPA, 2010). A síndrome DCC é complexa e inúmeras causas vêm sendo apontadas. Dentre as hipóteses de estudo, fatores associados à síndrome podem estar vinculados ao estresse causados por patógenos, manejo inadequado das colmeias, uso de agrotóxicos, má nutrição e a combinação entre estes fatores, sendo que não pode se afirmar que esses fatores são os responsáveis isoladamente pela síndrome (PIRES *et al.*, 2016).

Nos EUA, a *Agency Research Service* (ARS) vinculada ao *United States Department of Agriculture* (USDA) tem realizado, em parceria com outras instituições e Universidades, pesquisas relacionadas ao estudo dos fatores para DCC e a sanidade apícola (USDA, 2020a). Relatórios anuais estão disponíveis para consulta e fornecem um panorama do país frente ao número de colmeias, o percentual perdido e renovado, bem como colmeias perdidas com sintomas de DCC e identificam estressores para a saúde apícola (USDA, 2020b). Na Europa as diferentes causas da DCC também vêm sendo investigadas e apontam para a presença de patógenos, como o ácaro *Varroa destructor* e fungo *Nosema ceranae* juntamente com mudanças nas paisagens agrícolas que interferem na nutrição da colmeia e presença de agrotóxicos. Uma abordagem coordenada, junto aos Estados Membros da

Comunidade Europeia e outros países, vem sendo realizada pelo grupo COLOSS (Colony Losses) gerenciando cientistas, apicultores e indústria, buscando complementar as abordagens de investigação e criar novas alianças entre os membros da rede (COLOSS, 2020; PIRES *et al.*, 2016).

No Brasil, o primeiro relato de mortes de abelhas relacionados com a DCC foi realizado em 2010 por Message (2010) em Altinópolis, Estado de São Paulo. Outras regiões do país sofrem com perdas de abelhas, nem sempre com características associadas a DCC, mas sim com o uso de agrotóxicos nas áreas de apiários e aplicação incorreta dos mesmos (PIRES *et al.* 2016; GONÇALVES & CASTILHOS, 2015; GONÇALVES, 2012a, b). Em uma iniciativa para a obtenção de dados sobre a perda de grupos de abelhas no Brasil Gonçalves (2014) lançou uma plataforma no qual o aplicativo BEE ALERT recebe dados de apicultores sobre a perda de colmeias. Castilhos et al. (2019a) realizaram um levantamento de dados disponibilizados nesse aplicativo no período de 2013-2017, e com base nos dados fornecidos, chegaram a uma média de 1 bilhão de abelhas mortas nesse período. Outra iniciativa, esta promovida pelo Sindicato Nacional de Industria de Produtos pra Defesa Vegetal (SINDIVEG), foi a concepção do projeto Colmeia Viva visando a promoção de diálogo entre agricultores, apicultores e a indústria. Nesse projeto, Universidades como Unesp e UFSCar estiveram envolvidas na elaboração do Mapeamento de Abelhas Participativo (MAP), no período de 2015-2018, contribuindo para o plano de prevenção da mortalidade de abelhas e mitigação de incidentes (COLMEIA VIVA, 2017). Há ainda outras iniciativas nesse sentido de monitoramento que podem ser encontradas, como por exemplo, o aplicativo da Epagri-SC (Epagri, 2020). Tais iniciativas representam um movimento da sociedade brasileira, porém o fornecimento de dados são considerados subestimados haja vista que não há um sistema governamental federal oficial de monitoramento sistemático da sanidade apícola e para que ações e políticas públicas aconteçam, os dados devem ser gerados por órgãos oficiais, cujas ações ainda são incipientes, em virtude de necessidade de atendimentos, investigações, e demais providências decorrentes (PIRES et al. 2016).

1.2 Produtos apícolas estudados

1.2.1 Mel

O mel é um produto natural de sabor doce, produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de flores (mel floral), de secreções produzidas pelas plantas ou, ainda, de excreções oriundas de insetos que são depositadas nas plantas (mel de melato).

Essas substâncias são recolhidas pelas abelhas, transformadas, combinadas com substâncias específicas próprias e deixadas madurar nos favos da colmeia (CODEX ALIMENTARIUS, 2019; SILVA *et al.*, 2006; BRASIL, 2000).

É um alimento complexo e apresenta grande diversidade quanto à sua composição química (mais de 200 substâncias conhecidas), bem como características sensoriais (odor e cor) devido a condições climáticas, flora e espécie de abelha produtora. É constituído principalmente por carboidratos (frutose, glicose e sacarose), água e outras substâncias como proteínas, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, pigmentos e partículas sólidas, sendo que sua consistência varia de fluída a cristalizada. Variações na sua composição, características sensoriais e nutricionais podem ocorrer durante a estocagem (SILVA *et al.*, 2016; BOGDANOV, 2006; CODEX ALIMENTARIUS, 2019).

A composição geral do mel apresenta em torno de 17% de água e 70% de carboidratos (EMBRAPA, 2006). Abadio Finco *et al.* (2010) determinaram o teor de umidade do mel, proveniente de florada diversa do estado de Tocantins, sendo encontrados 18,9% e uma variação de 60,1-79,3% de açúcares redutores. Muradian & Bera (2007) relataram um teor de umidade em torno de 18% e uma variação de 62,7-76,2% de açúcares redutores em amostras coletadas no estado de São Paulo.

O mel tem sido comumente utilizado em associação a outro produto apícola, a própolis, com finalidade medicinal, pois a composição de ambos em proporções definidas possui um efeito antioxidante e anti-inflamatório superior ao uso apenas do mel. O mel puro apresenta características antimicrobianas e poder antioxidante, devido à presença de compostos fenólicos na sua composição. Ainda é utilizado em conjunto com outras ervas medicinais em preparos caseiros, no tratamento de feridas e queimaduras. O consumo também se dá como adoçante e em cereais matinais além de usos indiretos mais comuns como mel industrial presente na panificação e confeitaria. A utilização como suplemento vem ganhando espaço no hábito alimentar das pessoas devido ao seu alto valor nutritivo e sabor palatável (OSÉS *et al.*, 2016; ABADIO FINCO *et al.*, 2010; MURADIAN & BERA, 2007; EMBRAPA, 2006).

A produção de mel cresce substancialmente no país desde 1980, atingindo o patamar de 41 milhões em 2011 e mantendo-se estável até 2018 com um volume de 42,3 milhões de toneladas e gerando um faturamento de 502 milhões de reais no mesmo ano. Na distribuição da produção de mel por região, destaca-se a Região Sul como maior produtora, tendo sido responsável por 38,9% do total nacional na safra 2018 seguida das Regiões Nordeste (33,6%), Sudeste (21,8%). O estado do Rio Grande do Sul foi o maior produtor de

mel, respondendo por 6,4 milhões de toneladas da produção total nacional (15,2%), seguido pelo estado do Paraná (14,9%) e Piauí (12,3%) (IBGE, 2018).

Na Figura 01, observa-se a evolução no comparativo ao longo dos anos da produção melífera do país, de acordo com o IBGE.

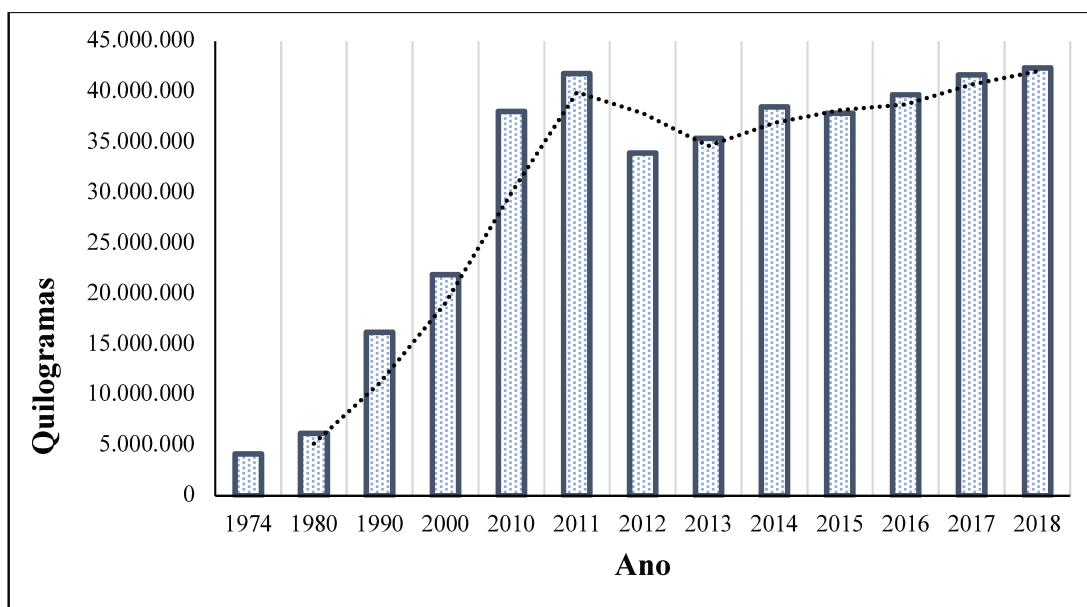


Figura 01. Evolução da produção de mel no Brasil.

Fonte: Adaptado de IBGE, 2018.

O mercado de exportação do mel brasileiro cresceu 12,5% em valor em 2017, comparando-se com o ano de 2016, atingindo 121 milhões de dólares e 27 mil toneladas em volume. Os EUA são o maior importador de mel do Brasil, com aquisição de 23 mil toneladas no ano de 2017, seguidos por Bélgica (913 mil quilos), Canadá (904 mil quilos) e Alemanha (818 mil quilos) (ABEMEL, 2018). O volume de mel exportado para os EUA representa 85% do volume total exportado, rendendo ao país aproximadamente 104 milhões de dólares.

O mel brasileiro ganhou o mercado norte-americano nos últimos anos ao ser certificado pela organização americana *True Source Honey* como um produto com baixo risco de adulteração, permitindo a isenção de sobretaxas na importação, o que ocorre com mel proveniente da China, a maior exportadora mundial (FOOD SAFETY, 2018).

1.2.2 Cera

A cera de abelha é um produto complexo secretado em forma líquida por glândulas localizadas no abdômen de abelhas operárias mais jovens. Contém mais de 300

substâncias diferentes, principalmente hidrocarbonetos saturados e insaturados e ésteres mono e di-insaturados e saturados e de cadeia longa. Outros componentes da cera de abelha são ácidos carboxílicos, alcoóis alifáticos livres e carotenoides (BOGDANOV, 2009; NEGRI *et al.*, 2000).

A composição da cera de abelha pode variar entre as diferentes famílias e tipos de abelhas, pois é provável que a produção de cera esteja intimamente relacionada à genética e dieta das mesmas (FRATINI *et al.*, 2016). A composição majoritária, de acordo com BOGDANOV (2009), está dividida em monoésteres (35%), diésteres (14%), hidrocarbonetos (14%), ácido livres (12%) e hidroxipoliésteres (8%).

A cor da cera de abelha recém-produzida é branca e depois fica amarela. É insolúvel em água e tem um odor típico, proveniente de abelhas, mel, própolis e pólen (BOGDANOV, 2009). No hemisfério norte sua produção ocorre principalmente entre abril e junho e as abelhas a utilizam para desenvolver os favos onde serão armazenados o mel e pólen para alimentar as larvas. Em forma de favos, as células hexagonais podem suportar até 1000 g de mel. É utilizada para selar o mel amadurecido e, quando misturada à própolis, protege a colmeia de infecções (BOGDANOV, 2004; KRELL, 1996).

A cera de abelhas é comumente utilizada na indústria cosmética, como por exemplo em cremes, óleos de tratamento e loções (30%), no preparo de produtos farmacêuticos contra inflamações musculares e de nervos (30%), mercado de velas (20%) e na própria prática apícola (20%) (BOGDANOV, 2004; BRADBPEAR, 2009).

Devido às suas propriedades antimicrobianas frente às bactérias gram-positivas e leveduras, as ceras de abelhas são utilizadas pela indústria alimentícia como aditivo alimentar. São aplicadas como agente de revestimento em coberturas comestíveis de queijos, frutas, e também em doces de confeitaria fina (PINTO *et al.*, 2017; FRATINI *et al.*, 2016; EFSA, 2007).

Na apicultura, a cera de abelha pode ser usada para atrair enxames para colmeias vazias e maximizar a produção de mel através da reciclagem dos favos de cera, pois, para produzir 1 kg de cera, são necessários em torno de 8 kg de mel para alimentar as abelhas produtoras (BRADBPEAR, 2009).

O mercado de cera de abelha no Brasil é difícil de mensurar, sendo os dados mais recentes disponibilizados no Censo Agropecuário de 2017, no qual constam 4.369 estabelecimentos que comercializaram 387 toneladas de cera de abelhas (IBGE, 2018).

1.3 Agrotóxicos

Agrotóxicos são quaisquer substâncias destinadas à prevenção, destruição ou controle de quaisquer espécies de pragas de plantas, incluindo animais indesejados durante toda a cadeia de produção de alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2016). No Brasil, os agrotóxicos são regidos pela Lei nº 7802/1989 e regulamentados pelo Decreto nº 4074/2002, que os denomina como produtos e agentes de processos químicos, físicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas e ecossistemas, além de ambientes urbanos (BRASIL, 1989).

Internacionalmente, o Codex Alimentarius estabelece regras relacionadas à segurança do uso de agrotóxicos através do seu Comitê Científico sobre Resíduos de Pesticidas (CCPR), contribuindo para que a comercialização (incluindo-se diretrizes relacionadas ao comércio mundial) de alimentos e consumo dos mesmos ocorram com qualidade e segurança. O CCPR é assessorado pelo JMPR (*Joint Meeting Pesticides Residues*), órgão *ad hoc* de especialistas em resíduos de agrotóxicos reconhecidos internacionalmente que prestam aconselhamento científico ao CCPR. Em suas reuniões, realizadas desde 1963, o JMPR realiza avaliações científicas de resíduos de agrotóxicos em alimentos conforme lista prioritária de agrotóxicos a serem avaliados/reavaliados enviada pelo CCPR (FAO, 2020).

O JMPR compreende o Grupo de Avaliação Básica da OMS e o Painel de Especialistas da FAO em Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos e Meio Ambiente. O Grupo de Avaliação Básica da OMS é responsável por avaliar os dados toxicológicos de agrotóxicos e estimar a Ingestão Diária Aceitável (IDA), doses agudas de referência (ARfDs) e caracterizar outros critérios toxicológicos. O Painel da FAO é responsável por avaliar os dados de resíduos de agrotóxicos e estimar os níveis máximos de resíduos (LMR), valores médios de resíduos de ensaios supervisionados (STMRs) e resíduos mais altos (HRs) em alimentos e rações (FAO, 2020).

Nacionalmente, o Comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB) gere 28 grupos técnicos (GT) que identificam segmentos interessados em fornecer subsídios ou pareceres sobre os documentos do Codex e discutem/elaboram o posicionamento da delegação brasileira junto ao Codex Alimentarius. No GT de resíduos de agrotóxicos (GTPR), sob coordenação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e com participação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são discutidos assuntos

propostos pelo CCPR, como: avaliação e reavaliação de ativos para estabelecimento de LMR; princípios de análise de risco; extrapolação de LMR (limite máximo de resíduo) para *minor crops*, dentre outros (MAPA, 2020).

Para o estabelecimento de um LMR é necessário que os estudos sejam avaliados em três frentes: Ministério da Saúde por meio da ANVISA, o (MAPA) e o Ministério do Meio Ambiente através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Os LMR são valores obtidos durante os testes de campo, onde são utilizadas as Boas Práticas Agrícolas para determinada cultura e, após a avaliação da IDA e do consumo de alimentos (dieta alimentar) é realizada. Assim toda documentação apresentada pela parte interessada à ANVISA é avaliada e a classificação toxicológica do agrotóxico é realizada (ARISSETO-BRAGOTTO *et al.*, 2017).

Recentemente foi adotado pela ANVISA um novo modelo de reclassificação de produtos já registrados, no qual se passou a utilizar os parâmetros de classificação toxicológica de agrotóxicos do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – GHS) (ANVISA, 2019).

A classificação em função da toxicidade aguda passa então a ser determinada e identificada conforme a Tabela 01.

Tabela 01. Classificação dos agrotóxicos relacionada à toxicidade aguda.

Categorias	Classificação
1	Produto Extremamente Tóxico – faixa vermelha.
2	Produto Altamente Tóxico – faixa vermelha.
3	Produto Moderadamente Tóxico – faixa amarela.
4	Produto Pouco Tóxico – faixa azul.
5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo – faixa azul.
Não Classificado	Produto Não Classificado – faixa verde

Fonte: ANVISA (2019)

Na avaliação ambiental, de competência do IBAMA, estão definidos na Portaria Nº 84 de 15/10/1996 os critérios para efeito de registro dos agrotóxicos. O mesmo deve ser realizado através da Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) e da Avaliação de Risco Ambiental (ARA). A PPA é baseada em parâmetros como bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial

mutagênico, teratogênico, carcinogênico obtidos em testes laboratoriais. A classificação é dada conforme Tabela 02 (BRASIL, 1996).

Tabela 02. Classificação dos agrotóxicos quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA).

Classe	Classificação
I	Produto Altamente Perigoso
II	Produto Muito Perigoso
III	Produto Perigoso
IV	Produto Pouco Perigoso

Fonte: BRASIL (1996)

Já a ARA também se baseia nesses pressupostos, mas considera a exposição potencial de organismos não-alvo, ou seja, o modo como o produto será utilizado na prática e suas possíveis consequências. Para a realização dos testes em organismos não-alvo, a abelha *Apis mellifera* é utilizada como representante dos insetos polinizadores por ter ampla distribuição geográfica, ter a biologia bem conhecida e ser facilmente criada e mantida em laboratório. Assim, o IBAMA publicou a Instrução Normativa (IN) nº 02 de 10/02/2017, norma específica baseada em uma abordagem de risco seguindo orientações internacionais, como o *Protocolo Internacional para Testes Químicos da Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE)*, *Guidelines for Ecological Risk Assessment* do US-EPA e outros (IBAMA, 2017).

De acordo com o Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas elaborado pelo IBAMA, a ARA envolve as seguintes etapas:

- Caracterização da exposição: fontes e rotas de exposição, quantidade ou concentrações esperadas do agrotóxico no meio ambiente e quais organismos, sistemas ou populações podem ser expostos;
- Caracterização da toxicidade: realizada através de testes agudos com a determinação da DL₅₀ (dose estimada associada à morte de 50% da população testada; duração máxima de 96 horas) e testes crônicos através da determinação do LOEC (menor nível em que se observa

algum efeito; realizado em período maior de vida do organismo ou em estágios de vida mais críticos);

- Caracterização do risco: realizado por meio do quociente de risco (QR), obtido pela razão entre a Concentração Ambiental Estimada (CAE) e o parâmetro de toxicidade (DL_{50} , por exemplo). No Brasil é possível utilizar o modelo BeeREX, planilha eletrônica que permite estimar as CAEs às quais as abelhas podem estar expostas, a depender do modo de aplicação e da dose do produto. O modelo calcula também o Quociente de Risco (QR), a partir das CAEs e dos parâmetros de toxicidade inseridos na planilha;
- Gerenciamento do risco: envolve estabelecimento de medidas para reduzir o risco identificado no processo de avaliação. São exemplos de medidas de gerenciamento a redução de doses, recomendações específicas de uso, restrição de uso, etc.

1.3.1 Mercado brasileiro de agrotóxicos

O Brasil é um dos maiores produtores agropecuários mundiais com, aproximadamente, 80 milhões hectares de área plantada em 2019, distribuídos principalmente entre as culturas de arroz, milho, soja, trigo, algodão e café (IBGE, 2020).

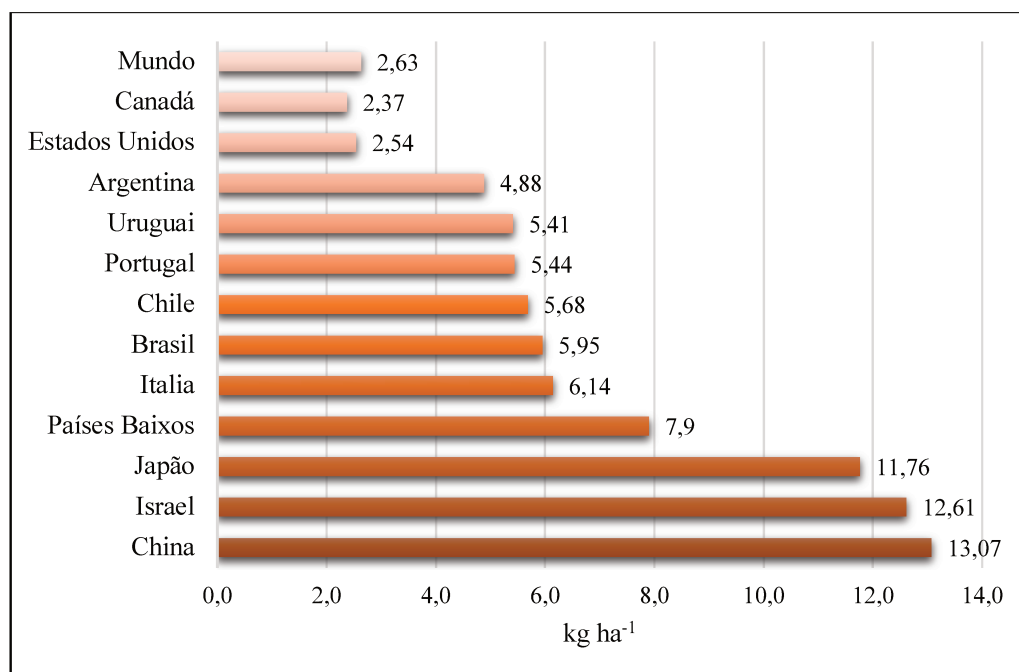
Segundo o último relatório de comercialização de agrotóxicos do IBAMA, em 2018 o país comercializou em torno de 785 mil toneladas de ingredientes ativos. Dentre os princípios ativos mais comercializados estão o glifosato (herbicida), acefato (inseticida) e mancozebe (fungicida) com, respectivamente, 195.056, 24.656 e 40.549 toneladas de ingrediente ativo (Tabela 03) (IBAMA, 2018).

Tabela 03. Ranking dos 10 princípios ativos mais comercializados no país.

Ingrediente Ativo	Comercialização (toneladas de ingrediente ativo)	Ranking
Glifosato e seus sais	195.056,02	1º
2,4-D	48.921,25	2º
Mancozebe	40.549,92	3º
Atrazina	28.799,34	4º
Acefato	24.656,79	5º
Dicloreto de paraquate	13.199,97	6º
Enxofre	10.409,69	7º
Imidacloprido	10.021,22	8º
Óleo mineral	9.112,53	9º
Oxicloreto de cobre	8.018,65	10º

Fonte: IBAMA (2018)

Considerando a área cultivada, o país consome em torno de 5,95 kg de ingredientes ativos por hectare plantado correspondendo a sétima posição no ranking da FAO (Figura 02) (FAOSTAT, 2020).

**Figura 02.** Uso de agrotóxicos dividido pela área total cultivada.

Fonte: Adaptado de FAOSTAT, 2020.

O consumo de agrotóxicos está distribuído por todas as cinco regiões brasileiras (Figura 03). Os estados do Mato Grosso (Centro-Oeste), São Paulo (Sudeste), Rio Grande do Sul (Sul), Bahia (Nordeste) e Pará (Norte), foram os maiores consumidores de ingredientes ativos no ano de 2017 com, respectivamente, 98.818, 81.494, 64.069, 27.068 e 9.003mil toneladas comercializadas (IBAMA, 2018).

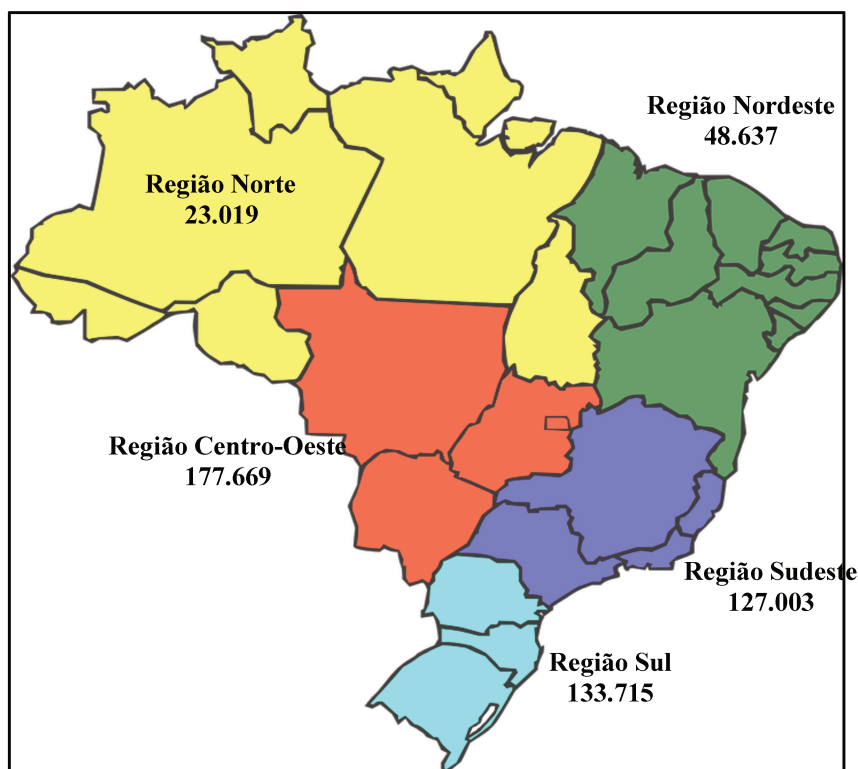


Figura 03. Distribuição do consumo de agrotóxicos por região brasileira no ano de 2017, em toneladas de ingredientes ativos (I.A.). Fonte: IBAMA, 2018.

1.3.2 Toxicidade dos agrotóxicos para abelhas e ocorrências em produtos apícolas

Durante o forrageamento das abelhas, microrganismos, agrotóxicos e outras partículas em suspensão podem ficar retidos em seus pelos superficiais ou serem inalados expondo esses insetos polinizadores de forma aguda ou crônica. Para a colmeia, a exposição se dá principalmente devido a contaminantes presentes no material coletado como pólen, néctar e água. Em ambas situações, tais contaminantes podem acumular-se, transformar-se e propiciar a contaminação dos produtos apícolas (RISSATO *et al.*, 2007). A presença de contaminantes ainda pode diminuir a qualidade desses produtos, podendo colocar em risco a saúde humana (BARGAŃSKA & NAMIEŚNIK, 2010).

As fontes de contaminação dos produtos apícolas são divididas em ambiental e agrícola (indireta) e através da prática apícola (direta). Na contaminação ambiental,

indiretamente as abelhas estão sujeitas à exposição a metais pesados, elementos radioativos, agrotóxicos aplicados em áreas próximas, bifenilas policloradas (PCB) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA), sendo esses três últimos considerados poluentes orgânicos persistentes (POP). Diretamente, durante a prática apícola podem ser encontrados resíduos de combustão provenientes dos fumegadores para o manejo das abelhas (serragem de madeira não tratada, palhada de café, de arroz), agrotóxicos e fármacos veterinários, esses dois últimos têm uso permitidos em países do hemisfério norte, no Brasil não há produtos registrados para essa finalidade (BARGAŃSKA & NAMIEŚNIK, 2010; BOGDANOV, 2006).

Os produtos apícolas e as abelhas são considerados indicadores ambientais de contaminação, refletindo os níveis de poluição ambiental. A cera de abelhas, por exemplo, absorve toxinas solúveis em gordura, sendo que a liberação das mesmas pode ocorrer ainda na colmeia, contaminando as abelhas ou ainda os produtos alimentícios e/ou cosméticos nos qual a cera será agregada (BRADBPEAR, 2009).

As contaminações por agrotóxicos vêm sendo estudada com mais atenção devido aos seus impactos no comportamento dos insetos polinizadores. Além dos inseticidas, a classe dos herbicidas também passou a ser objeto de estudo devido aos possíveis efeitos direto e indireto para as abelhas.

Dentre a classe de inseticidas, a de maior dano conhecido a abelhas são inseticidas neonicotinoides, originários a partir da molécula de nicotina, sintetizados no início dos anos 90. Atuam no sistema nervoso central de insetos como agonistas da acetilcolina (ACh) imitando seu efeito. Esta ligação é duradoura, pois os neonicotinoides são insensíveis à ação da acetilcolinesterase (AChE) e mantem ativação permanente da ACh causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (JESCHKE & NAUEN, 2005). Estão associados ao comprometimento da memória, alterações no comportamento das abelhas forrageiras, dificuldades na comunicação entre elas e interferências no mecanismo de defesa, deixando as mesmas suscetíveis a patógenos (DECOURTYE & DEMILLERS, 2010). O imidacloprido, tiametoxam e clotianidina, representantes dessa classe de inseticidas, tiveram seu uso restrito em 2013 na Europa e em 2018 foram proibidos para uso externo, sendo permitido apenas em casas de vegetação (EFSA, 2018; EC, 2013; EFSA, 2013). No Brasil, não há restrições para o uso dos inseticidas neonicotinoides e inúmeros apicultores tiveram perdas de colônias devido à pulverização desses inseticidas em áreas agrícolas (CASTILHOS *et al.*, 2019b; ERENO, 2014).

Outra classe de inseticidas são os organofosforados. Surgiram na década de 40, mas os principais representantes desta classe foram introduzidos na década de 60 a 80 em substituição aos inseticidas organoclorados. Possuem grupo químico formado por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo. Os organofosforados apresentam baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente e acúmulo limitado em organismos vivos, porém são tóxicos aos insetos (SANTOS V.M.R. *et al.*, 2007; SANTOS M.A.T. *et al.*, 2007). Já os inseticidas carbamatos surgiram na década de 60, são agrotóxicos derivados de ésteres de ácido carbâmico. Ambas as classes de inseticidas atuam como inibidoras da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os organofosforados e carbamatos se ligam à AChE inibindo sua ação resultando em acúmulo de ACh na sinapse. Causam hiperexcitabilidade devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos gerando tremores, convulsões, colapso do sistema nervoso central e morte. Nos organofosforados, a ligação é bem mais forte e praticamente irreversível enquanto que nos carbamatos ela é reversível, podendo ocorrer uma recuperação do inseto (BOVI, 2013; PINHEIRO & FREITAS, 2010; SANTOS V.M.R. *et al.*, 2007).

O grupo de inseticidas conhecidos como piretróides apresentam estrutura semelhante à piretrina (compostos naturais derivados do *Chrysanthemum cinerariaefolium*). Atuam como moduladores dos canais de sódio mantendo a entrada permanente de íons sódio (Na^+) causando uma intoxicação que resulta na transmissão de impulsos repetitivos e descontrolados, hiperexcitabilidade, perda locomotora, paralisia e morte (SANTOS V.M.R. *et al.*, 2007; SANTOS M.A.T. *et al.*, 2007). São largamente utilizados contra uma gama de ectoparasitas em pequenos e grandes animais. Os principais piretroides utilizados em medicina veterinária em cães, gatos e animais de corte são ciflutrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina. Na agricultura, são mais utilizadas permetrina, cipermetrina e deltametrina (SANTOS M.A.T. *et al.*, 2007). Os piretroides sintéticos apresentam ação tóxica para insetos maior do que as piretrinas, sendo muito utilizados em aerossóis de uso doméstico.

O uso de herbicidas também vem afetando as abelhas, pois apesar de possuírem mecanismo específico de ação e não apresentarem toxicidade aguda relevante para as abelhas, como o glifosato ($\text{LD}_{50} > 100 \mu\text{g bee}^{-1}$), em estudos recentes, abelhas expostas a doses subletais deste herbicida apresentaram diminuição da sensibilidade à recompensa e diminuição da memória associativa, o que compromete o retorno das abelhas para suas colmeias após o forrageamento (EFSA, 2015; HERBERT *et al.*, 2014). Além disso, como efeito indireto, o uso de herbicidas afeta a nutrição desses insetos reduzindo as fontes de

coleta de néctar ao eliminar plantas não alvo que poderiam fornecer alimento (GILL *et al.*, 2018; PINHEIRO & FREITAS, 2010).

Diversos autores destacam a ocorrência frequente de contaminação em produtos apícolas por contaminantes, principalmente agrotóxicos estando alguns deles representados por suas estruturas químicas na Figura 04.

Codling *et al* (2016) relataram a presença de resíduos de clotianidina em 68% das amostras de mel analisadas no Canadá, sendo a média de concentração de 17, 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Imidacloprido foi detectado por diferentes autores em matrizes como mel e abelhas no Brasil e exterior (CASTILHOS *et al.*, 2019b; ORSO *et al.*, 2015; KILJANEK *et al.*, 2016)

Analisando abelhas, pólen e mel, Al Naggar *et al.* (2015) verificaram a presença de organofosforados como dimetoato e diclorvós em mel, malation e clorpirifós no pólen e, nas abelhas, foram detectados diazinon e clorpirifós. Christodoulou *et al.* (2015) encontraram coumafós em mel em concentrações de até 41 $\mu\text{g kg}^{-1}$. García *et al.* (2017), em análise de cera de abelhas, encontraram concentrações dos piretroides tau-fluvalinato e clorfenvinfós utilizados no combate ao ácaro *Varroa*, sendo este último não registrado para tal tratamento na comunidade europeia. Ainda detectaram em menores concentrações permetrina e cipermetrina. Mullin *et al.* (2010) encontraram em pólen nível de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de resíduos de carbaril.

Recentemente, o glifosato vem sendo encontrado no mel em níveis residuais. Rubio *et al.* (2014) analisaram 69 amostras e detectaram a presença do herbicida em 51 amostras de mel, enquanto Zoller *et al.* (2018) detectaram glifosato (GLI) em 94% de amostras de mel.

Na Tabela 04, a seguir, estão apresentadas algumas ocorrências de classes de agrotóxicos em produtos apícolas.

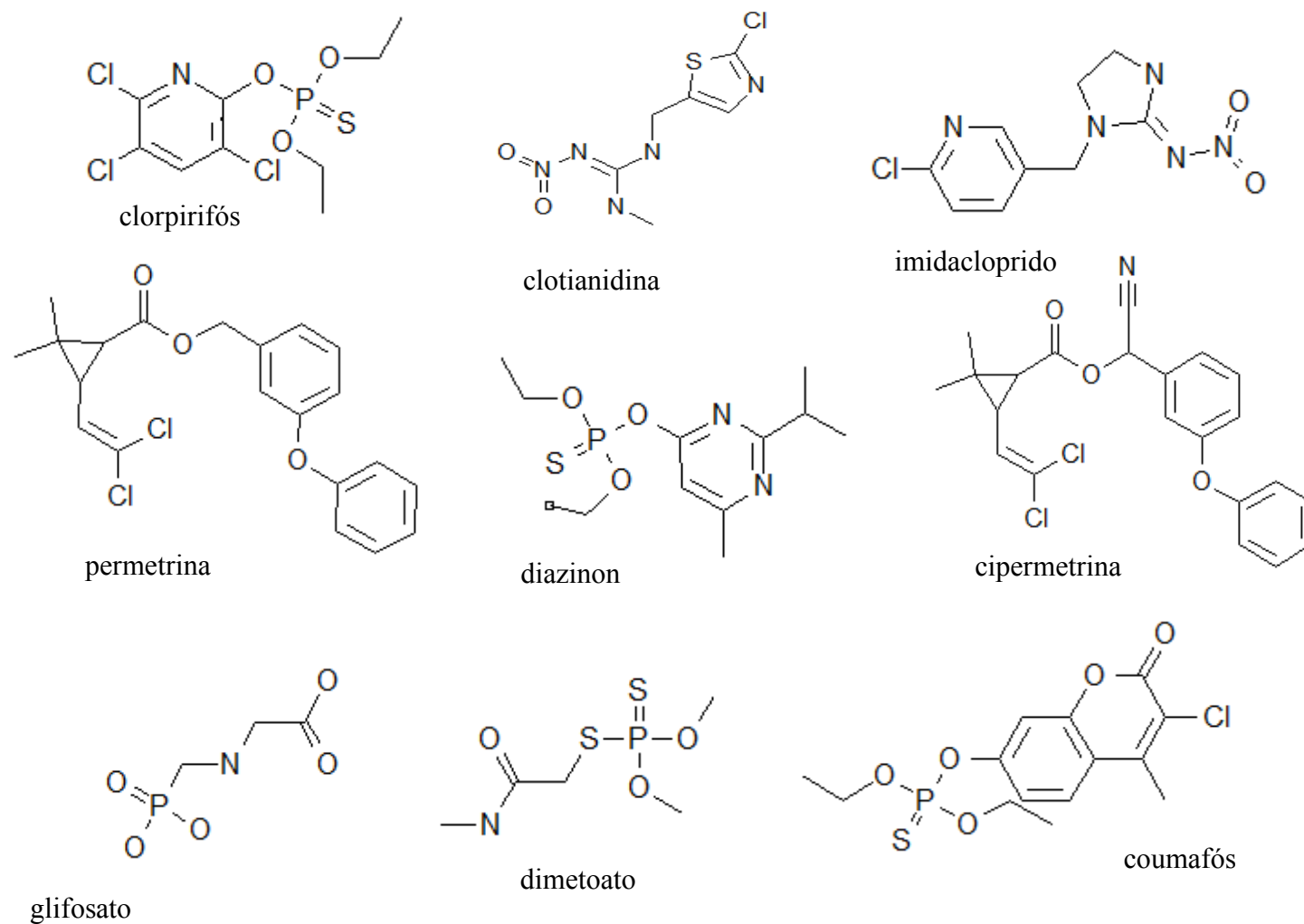


Figura 04. Agrotóxicos detectados em diferentes estudos e/ou relatados como danosos a insetos polinizadores (Fonte: elaboração própria).

Tabela 04. Ocorrência e níveis de agrotóxicos em produtos apícolas. (Fonte: Elaboração própria.)

Agrotóxicos	Matriz	Amostras		Nível máximo ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (<i>composto</i>)	Referência (<i>país</i>)
		Analizadas	Positivas (%)		
Organofosforados, organoclorados	Mel	72	94	15,4 (<i>DDT</i>)	Panseri <i>et al.</i> , 2014 (<i>Italia</i>)
Organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos, azoles e outros	Mel	36	58,6	41 (<i>coumafós</i>)	Christodoulou <i>et al.</i> , 2015 (<i>Chipre</i>)
Organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos, azoles e outros	Favo	50	100	9.308 (<i>coumafós</i>)	Garcia <i>et al.</i> , 2017 (<i>Espanha</i>)
Neonicotinoides, organofosforados, azoles e outros	Abelhas	74	98,6	55.800 (<i>DMPF</i> ¹)	Kiljanek <i>et al.</i> , 2016 (<i>Polônia</i>)
Carbamatos, organofosforados, piretroides	Abelhas, pólen e cera	4 (cada)	100	251 (μg - fluvalinato ²)	Li <i>et al.</i> , 2015 (<i>Estados Unidos</i>)
Organoclorados e piretroides	Mel	98	68	0,043 (<i>DDD</i>)	Malhat <i>et al.</i> , 2015 (<i>Egito</i>)
Neonicotinoides	Abelhas, pólen e mel	16,19 e 26 respec.	86,58,56 respec.	80 (<i>clotianidina</i>),250 (<i>tiametoxam</i>),60 (<i>clotianidina</i>) respec.	Codling <i>et al.</i> , 2016 (<i>Canadá</i>)
116 compostos, diferentes classes	Mel	100	1	0,029 (<i>triclorfon</i>)	Tette <i>et al.</i> , 2016

					(Brasil)
92 compostos, diferentes classes	Mel	43	44	10 (dimetoato)	Orso <i>et al.</i> , 2015 (Brasil)
63 compostos, diferentes classes	Abelhas, pólen e cera	45,45,43	33,88 e 100	168 (fluvalinato),458 (clorfenvinfós) e 5,34 x 10 ⁴ (coumafós)	Calatayud-Vernich <i>et al.</i> , 2018 (Espanha)
Glifosato	Mel	16	94	0,016	Zoller <i>et al.</i> , 2018 (Suiça)
Glifosato	Mel	69	59	163	Rubio <i>et al.</i> , 2014 (Estados Unidos)
30 compostos, diferentes classes	Cera	16	100	2.900 (coumafós)	Harriet <i>et al.</i> , 2017 (Uruguai)
Glifosato	Mel	200	98,8	0,05	Thompson <i>et al.</i> , 2019 (Canada)
58 compostos e metabólitos	Cera	35	100	17,3 (coumafós)	Calatayud-Vernich <i>et al.</i> , 2017 (Espanha)
Fipronil e neonicotinoides	Abelhas	114	-	2.098 (fipronil)	Castilhos <i>et al.</i> , 2019b (Brasil)
26 compostos	Pólen	21	7	432 (bioaletrina)	Oliveira <i>et al.</i> , 2016 (Brasil)

¹metabólito do agrotóxico Amitraz; ² encontrado em amostra de cera; respec.: respectivamente

1.3.3 Limites máximos de resíduos e programa de monitoramento

Resíduos de agrotóxicos são

“substâncias remanescentes ou existentes em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas tóxicas *ou ambientalmente importantes*” (BRASIL, 1992).

Já o LMR é definido como

“quantidade máxima de resíduo de agrotóxico oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg)” (BRASIL, 1992).

Como ferramenta de gerenciamento de risco, o MAPA estabeleceu através da Portaria Ministerial nº 51/1986 o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, posteriormente alterado pela Instrução Normativa SDA nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Atualmente chamado de Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), prevê a adoção de programas setoriais de controle de resíduos em carne, leite, mel e pescado, para o uso de agrotóxicos, medicamentos veterinários e metais pesados, com o objetivo de promover segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no Brasil. No âmbito dos programas são elaborados planos anuais de amostragem e teste de ovos, leite e mel encaminhados para processamento e animais encaminhados para abate em estabelecimentos sob Inspeção Federal. Os testes incluem ampla gama de fármacos veterinários autorizados (para as quais é testado o atendimento dos limites aplicáveis) e proibidas (incluindo hormônios), agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, micotoxinas e dioxinas (BRASIL, 2019).

O escopo de substâncias para monitoramento tem se dado com base em ranqueamento e priorização de substâncias levando em consideração diversos aspectos, entre eles: tipo e severidade do efeito adverso na saúde humana associada ao resíduo; persistência do resíduo nos tecidos comestíveis e produtos animais; perfil de consumo dos produtos de origem animal implicados; probabilidade de ocorrência do resíduo em concentração e

frequência que representem risco aos consumidores; e implicações no comércio internacional. A amostragem utilizada assegura ao MAPA, ao nível de 95% de confiança, que será detectada ao menos uma amostra violada se o nível de violação for igual ou superior a 0,5% na população amostrada utilizando como base o *Guideline* do Codex Alimentarius CAC/GL 71-2009 (MAPA, 2019).

No subprograma PNCRC/Mel, na última rodada foram previstas análises para as seguintes classes de agrotóxicos: organoclorados, neonicotinoides, organofosforados, piretroides e carbamatos e alguns herbicidas. O glifosato não foi contemplado até o momento (BRASIL, 2019).

Para resíduos de agrotóxicos em mel o PNCRC/Mel estabelece limites de referência para nortear a determinação desses resíduos (Tabela 05). Além disso, os demais produtos apícolas não estão inclusos em nenhum programa de monitoramento no país.

Tabela 05. Plano de amostragem e alguns limites de referência adotados no PNCRC/Mel no ano de 2019.

Grupo	Agrotóxico	Limite de referência ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nº amostras
Organoclorados	Aldrin, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4 DDT, dodecacloro, endrin heptacloro, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, α -endossulfân	10	60
	Tetradifona, vinclozolina, parationa	20	
	Carbofuran, carbaril	50	
Carbamatos	Aldicarb + aldicarbe sulfona, benfuracarbe, carbosulfan	10	45
	Acefato	20	
Organofosforados	Clorpirifós	50	
	Diazinon, diclorvós, clorfenvinfós, dimetoato	10	
	Aletrina	10	
Piretroides	Ciflutrina, cipermetrina	50	
	Permetrina	880	
Neonicotinoides	Acetamiprida, imidacloprido	50	

Fonte: adaptada de BRASIL, 2019.

1.4 Métodos de análise para determinação de agrotóxicos

Métodos de análise de resíduos de agrotóxicos devem ser desenvolvidos para produzir resultados precisos e válidos e o método analítico deve ser adequado ao propósito da análise (LEHOTAY, 2018). Os métodos analíticos são baseados em etapas que compreendem o preparo de amostra e extração dos analitos de interesse, limpeza dos extratos e análise quantitativa. A etapa de extração baseia-se em transferir os compostos de interesse da matriz a

uma fase orgânica ou aquosa (no caso de analitos extremamente polares). Muitas vezes, é um processo longo e que consome solvente em grandes quantidades.

Em análises multirresíduos, diferentes solventes podem ser utilizados (acetonitrila, acetona, acetato de etila e metanol) e a extração normalmente ocorre com uso de agitação manual ou mecânica. Diferentes sais podem ser utilizados a fim de favorecer a transferência dos analitos de interesse para a fase orgânica, efeito conhecido como “*salting-out*”. Ainda, pode-se estabelecer um tampão e manter o pH em valor intermediário a fim de evitar degradação de compostos sensíveis (LEHOTAY & COOK, 2015; REJCZAK & TUZIMSKI, 2015).

Ao extrair os compostos de interesse, geralmente se coextrai compostos inerentes da matriz. Matrizes derivadas de animais, como mel e cera, por exemplo, são complexas e possuem características únicas. Assim, fatores como as características físico-químicas dos analitos e a complexidade da matriz, devem ser levados em conta na escolha da melhor etapa de limpeza.

O primeiro método multirresíduos para extração de agrotóxicos foi desenvolvido por Mills, nas instalações do U.S. Food and Drug Administration (FDA), na década de 1960. Voltado para os inseticidas organoclorados, o método baseava-se na extração dos compostos de alimentos não gordurosos com acetonitrila e posterior partição em éter de petróleo (partição líquido-líquido) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Posteriormente, com o advento de novas classes de agrotóxicos (por exemplo, inseticidas organofosforados), novos métodos necessitaram de desenvolvimento para abarcar essas classes. Surgiu então o Método de Luke, desenvolvido por Luke *et al.* na década de 70 em substituição ao método Mills do FDA (LUKE *et al.*, 1975). O método consistia, em linhas gerais, de uma etapa de extração de 100 g de amostra utilizando acetona (200 mL), seguida de uma partição líquido-líquido com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano) (Figura 05). A adição de sais secantes como NaCl e NaSO₄ proporcionavam maiores recuperações para os compostos polares, favorecendo a transferência destes para a fase orgânica e, assim, o método Luke tornou-se oficial (AOAC 985.22) sendo aplicado em todo o mundo (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

Na década de 80 otimizações foram realizadas no Método de Luke visando melhora nas recuperações dos compostos, rapidez na execução e diminuição do uso de solventes apolares. Dentre as modificações, a miniaturização do método foi realizada, método chamado de Mini-Luke, no qual não se utilizava NaCl. O método Mini-Luke proporcionou a diminuição da massa de amostra (15 gramas frente a 100 gramas utilizado no método de

Luke) e volume de solvente (30 mL de acetona frente a 200 mL anteriormente). Manteve-se o uso de solventes apolares, porém esses também em menor quantidade (30 mL) (PRESTES *et al.*, 2009).

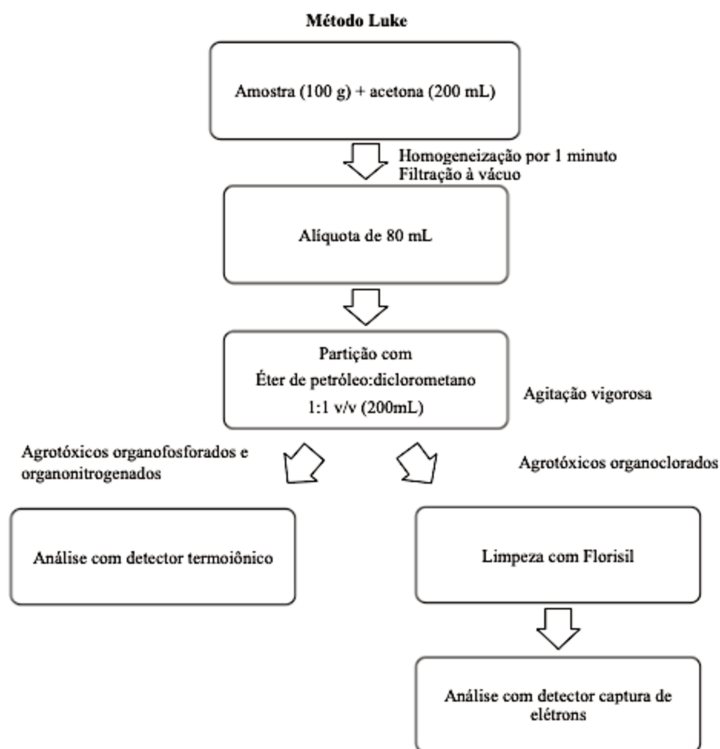


Figura 05. Esquema do método Luke para análise multirresíduos em alimentos (Adaptado de Luke *et al.*, 1975).

Já nos anos iniciais da década de 90 a consciência de que o uso de solventes apolares representa um problema para o meio ambiente e para a saúde do analista fez com que novas técnicas de preparo de amostras fossem desenvolvidas, entre elas a extração em fase sólida (SPE). A SPE foi inicialmente desenvolvida como um complemento ou substituição para a extração líquido-líquido. Os principais objetivos da técnica são o enriquecimento do traço (concentração), a simplificação da limpeza do extrato da matriz (*cleanup* do extrato) e a troca do meio (transferência do extrato da amostra para um solvente diferente ou para a fase gasosa) (PRESTES *et al.*, 2009; POOLE, 2003).

Nos anos 2000, em busca de praticidade, simplicidade e redução de tempo e custos de análise, Anastassiades *et al.* (2003) desenvolveram um método de preparo da amostra (extração e purificação) para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, denominado QuEChERS (rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). O método tem como vantagem a extração de vários analitos de interesse em apenas três etapas: extração com

solvente, partição com sais e limpeza do extrato através de fase dispersiva para remoção dos interferentes, diminuindo o efeito matriz (Figura 06)

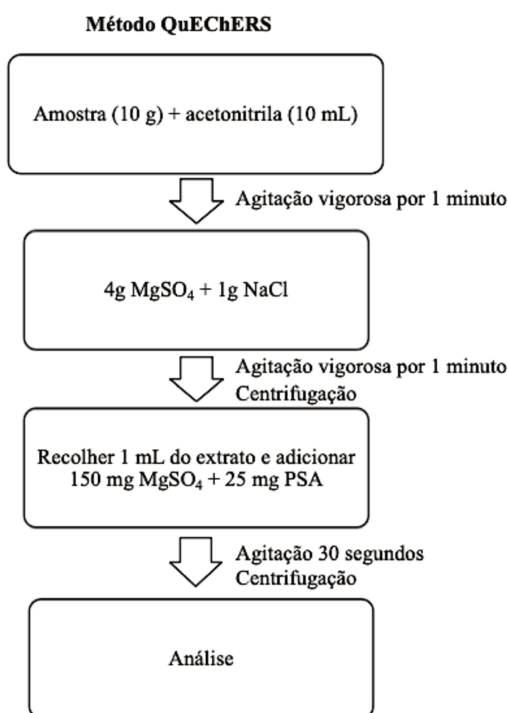


Figura 06. Esquema do método original QuEChERS para análise multirresíduos em alimentos (Adaptado de Anastassiades *et al.*, 2003).

O método QuEChERS original baseia-se na extração com acetonitrila, um solvente com capacidade de extrair uma gama maior de analitos de diferentes polaridades e compatível com técnicas cromatográficas. Na etapa de partição é recomendado a adição sais secantes como o MgSO_4 a fim de remover a água presente na fase orgânica e facilitar a extração de compostos polares. Além disso a hidratação do MgSO_4 é uma reação exotérmica (aquecimento em torno de $40\text{-}45^\circ\text{C}$) que favorece a extração de compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2011). Ainda na etapa de partição são adicionados NaCl para potencializar o efeito “*salting-out*”. A limpeza dos extratos é realizada por extração chamada de dispersiva (d-SPE) e proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares (CABRERA *et al.*, 2012) O sorbente etilenodiamino-N-propil, uma amina primária e secundária (PSA -*primary secondary amine*), possui alto efeito quelante e é utilizado nessa etapa. Possui estrutura bidentada o que permite sua atuação como trocador aniônico retendo interferências da matriz como ácidos graxos livres e de outros compostos polares (PRESTES *et al.*, 2011).

Modificações no método QuEChERS têm sido realizadas com o intuito de ampliar o escopo de aplicação resolvendo problemas como estabilidade e recuperação dos analitos de acordo com o pH da matriz. O uso de sorbentes em associação com o PSA entre eles C18 (octa- decilsilano) para remoção de interferentes apolares e GCB (*graphitized carbon black*) para remoção de pigmentos, na etapa de limpeza (d-SPE) bem como o uso de uma maior quantidade de PSA foram algumas das adaptações realizadas. Além disso o uso de tampão a fim de estabilizar compostos dependentes de pH também foram estudados e incorporados ao método original. O tampão acetato (pH 4,8) foi adaptado por Lehotay et al. (2007) e tornou-se método oficial AOAC e o tampão citrato (pH 5 – 5,5) adaptado por Anastassiades et al. (2007) tornou-se o método oficial da União Europeia. Tais otimizações do método permitem a expansão do número de matrizes e compostos a serem analisados, assim como aumentam o percentual de recuperação dos analitos (PRESTES *et al.*, 2011).

Assim, o método QuEChERS, em suas diferentes versões, tem sido o mais utilizado para a extração simultânea de agrotóxicos em diferentes matrizes, como leite (AGUILERA-LUIZ *et al.*, 2011), trigo, pepino, vinho (ORTEGA *et al.*, 2012), papinha de maçã para bebês, farinha de trigo, páprica, pimenta preta, sementes de girassol (LACINA *et al.*, 2012), arroz e milho (ZHANG *et al.*, 2013), peixes (HASHIMOTO *et al.*, 2012), mel (BARGAŃSKA *et al.*, 2014; SHENDY *et al.*, 2016), pólen (OLIVEIRA *et al.*, 2016) e cera de abelhas (CALATAYUD-VERNICH *et al.*, 2017).

Para análises de compostos com propriedades físico-químicas específicas (extremamente polares ou ácidos), métodos individuais são utilizados. Assim, para extração, recorre-se ao uso de condições ácidas e solventes mais polares, como água. São métodos mais demorados e se aplicam a poucos compostos. O herbicida glifosato e seus metabolitos, por exemplo, não estão inseridos em análises multirresíduos devido a essas características supracitadas. Dentre os métodos individuais para análise de compostos extremamente polares, Cowell et al. (1986) desenvolveram um método para determinação de resíduos de glifosato baseado na concentração e o isolamento via troca iônica de quelação, com subsequente quantificação por HPLC com detector de fluorescência, através de reação pós-coluna aplicado a matrizes como: alfafa, repolho, uva, grão de soja e água. Recentemente, Anastassiades et al. (2020) no laboratório de referência europeu (EURL-SRM), desenvolveram um método para a análise desses resíduos de agrotóxicos, em alimentos de origem vegetal e de origem animal denominando de QuPPE (quick polar pesticide extraction). O método envolve extração com metanol acidificado, complexação com EDTA e quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

A técnica de determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia líquida, acoplada a detectores espectrofotométricos como fluorescência (FLD, do Inglês *Fluorescence Detector*), ou cromatografia gasosa com detectores de captura de elétrons (ECD, do Inglês *Electron Capture Detector*) e nitrogênio-fósforo (NPD, do Inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*) são utilizadas amplamente e apresentam eficiência da separação garantida por novos tipos de colunas cromatográficas e sistemas de injeção (split, split/splitless, injetor com temperatura programável).

Já a cromatografia líquida ou gasosa acopladas a espectrômetro de massas (LC-MS, do Inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*; GC-MS, do Inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) traz como vantagem a alta seletividade do detector e a obtenção de informações estruturais, de massa molecular, além de maior poder de detectabilidade proporcionada pelos analisadores de massas.

Diversos autores têm relatado o uso das técnicas de LC-MS e GC-MS para quantificação simultânea de resíduos de agrotóxicos em abelhas e produtos apícolas. Kujawski *et al.* (2014) determinaram a presença de resíduos de 30 agrotóxicos, de 15 classes diferentes, em mel por LC-MS/MS. Tapparo *et al.* (2013) analisaram 5 neonicotinoides e um de seus metabólitos em abelhas expostas a estes inseticidas, utilizando as técnicas de cromatografia líquida acoplada aos detectores de arranjo de diodos e massas, enquanto que Gbylik-Sikorska *et al.* (2015) fizeram a avaliação dos neonicotinoides nas mesmas matrizes, também utilizando LC-MS/MS.

A Tabela 06, a seguir, apresenta um resumo dos principais métodos de extração e quantificação aplicados em amostras de produtos apícolas descritos na literatura recentemente.

Tabela 06. Métodos de extração, limpeza e quantificação de agrotóxicos em produtos apícolas. (Fonte: Elaboração própria.)

País	Agrotóxicos	Matriz	Método Extração	Solvente Extrator	Clean up	Sorbente	Deteção	Referência
Brasil	35 classes diferentes	Mel	QuEChERS adaptado	CH ₃ CN:CH ₃ COOC ₂ H ₅ (7:3) 1% ácido acético	d-SPE	PSA Florisil	LC-MS/MS	Tette <i>et al.</i> , 2016
Brasil	92 compostos	Mel	Líquido-líquido	Buffer McIlvaine	d-SPE	Florisil	LC-MS/MS	Orso <i>et al.</i> , 2015
Canadá	Neonicotinoides	Mel, pólen e abelhas	QuEChERS adaptado	Acetonitrila	d-SPE	PSA	LC-MS/MS	Codling <i>et al.</i> , 2016
Chipre	Carbamatos Triazoles	Mel	Líquido-líquido	Acetato de etila	-	-	LC-MS/MS GC-ECD	Christodoulou <i>et al.</i> , 2015
Egito	Organofosforados	Mel, polén e abelhas	QuEChERS adaptado	CH ₃ CN: H ₂ O 1%ácido acético	SPE	C ₁₈	LC-MS/MS	Al Naggat <i>et al.</i> , 2015
Espanha	5 classes (160 compostos)	Favo	QuEChERS adaptado	Acetonitrila	d-SPE	PSA C ₁₈	GC-MS/MS	García <i>et al.</i> , 2017
Estados Unidos	Glifosato	Mel	Líquido-líquido	Ácido clorídrico 1 mol L ⁻¹	-	-	ELISA*	Rubio <i>et al.</i> , 2014
Itália	Organoclorados Organofosforados	Mel	Líquido-líquido	Acetato de etila	SPE	Florisil	GC-MS/MS	Panseri <i>et al.</i> , 2014
Polônia	200 compostos	Abelhas	QuEChERS adaptado	CH ₃ CN 1% ácido acético	d-SPE	PSA ZSep ⁺	LC-MS/MS GC-MS/MS	Kiljanek <i>et al.</i> , 2016
Canadá	Glifosato	Mel	Líquido-líquido	Água	SPE on line	Oasis HLB	LC MS/MS	Thompson <i>et al.</i> , 2019

Suíça	Glifosato	Mel	Líquido-líquido	Água/Metanol	SPE	Oasis HLB	LC-MS/MS	Zoller <i>et al.</i> , 2018
União Europeia	Glifosato	Mel	Líquido-líquido	Metanol acidificado	-	-	LC-MS/MS	Anastassiades <i>et al.</i> , 2020
Uruguai	Glifosato	Mel	Líquido-líquido	Água/Metanol	QuPPE	-	IC- MS	Pareja <i>et al.</i> , 2019
Espanha	63 compostos e metabólitos	Abelhas, pólen e cera	Líquido-líquido	Acetonitrila	d-SPE	PSA C ₁₈	LC-MS/MS	Calatayud-Vernich <i>et al.</i> , 2018
Espanha	58 compostos e metabólitos	Cera	QuEChERS adaptado	Acetonitrila	d-SPE	PSA C ₁₈	LC-MS/MS	Calatayud-Vernich <i>et al.</i> , 2017
Uruguai	30 compostos	Cera	Líquido-líquido	Acetonitrila	d-SPE	PSA C ₁₈	LC-MS/MS GC-MS/MS	Harriet <i>et al.</i> , 2017

QuPPE: Quick polar pesticides extraction;IC: íon chromatography*método de diagnóstico

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As abelhas, como um dos principais agentes polinizadores, contribuem na produção de cerca de 75% dos alimentos no mundo. Dados da literatura apontam os diferentes fatores que afetam o desempenho dos insetos polinizadores causando o declínio da população dos mesmos. No Brasil, um dos principais fatores ameaçadores à saúde das abelhas e outros insetos polinizadores é o uso de agrotóxicos. A presença de resíduos dos mesmos na água, néctar, no pólen e nas abelhas podem ser carregados para dentro da colmeia e contaminar produtos apícolas. O país é um grande produtor e consumidor de agrotóxicos, principalmente do herbicida glifosato (mais comercializado) e de inseticidas de efeito danoso aos insetos polinizadores, inclusive alguns deles com uso restrito em países europeus, como os neonicotinoides, porém permitidos em nosso país. Dentro desse contexto, estudos estão sendo desenvolvidos para identificação e quantificação da presença de resíduos de agrotóxicos e sua dispersão dentro (cera, mel, pólen, favo e abelhas) e fora (abelhas) da colmeia.

Nos últimos anos, os trabalhos publicados apresentam uso de técnicas cromatográficas (líquida e gasosa) associadas a diferentes detectores (fluorescência, espectrômetro de massas, captura de elétrons, etc) para a quantificação de resíduos de agrotóxicos nas matrizes apícolas. Os métodos analíticos relatados são caracterizados por sua alta sensibilidade e seletividade, menor quantidade de reagentes utilizados e pequena massa amostral. Devido às diferentes características físico-químicas dos agrotóxicos e da complexidade das matrizes, os preparos de amostras diferenciam-se, sendo mais recorrentes os que utilizam técnicas de *salting out* e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) (conhecidos como QuEChERS).

Num futuro próximo, lacunas como a necessidade de implementação efetiva de um plano nacional de boas práticas apícolas-agrícolas robusto, e de uma legislação que estabeleça os limites máximos de resíduos presente em produtos apícolas e de condições laboratoriais que permitam ações de fiscalização, poderão ser preenchidas a fim de manter e promover a contribuição de insetos polinizadores no contexto da segurança alimentar e da seguridade dos alimentos. Assim, é fundamental o aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de identificar resíduos de agrotóxicos em quantidades compatíveis às doses subletais e não apenas às letais, além de detecção em quantidades menores de matriz. A Universidade pode e

deve contribuir efetivamente através de seus laboratórios que já realizam esse tipo de análise, fornecendo dados isentos e de qualidade científica.

REFERÊNCIAS

ABADIO FINCO, D.B., MOURA, L.L., SILVA, I.G. (2010). Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30 (3), 706–712. DOI 10.1590/S0101-20612010000300022.

ABEMEL. (2018). Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. Setor apícola brasileiro em números. Disponível em <http://www.conap.coop.br/wp-content/uploads/2017/01/INTELIGÊNCIA-COMERCIAL-ABEMEL_DEZEMBRO-CONSOLIDADO.pdf> Acesso em 19/08/2020.

AGUILERA-LUIZ, M. M., PLAZA-BOLAÑOS, P., ROMERO-GONZÁLEZ, R., VIDAL, J. L. M., FRENICH, A. G. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2863-2875. DOI 10.1007/s00216-011-4670-7.

AL NAGGAR, Y., CODLING, G., VOGT, A., NAIEM, E., MONA, M., SEIF, A., GIESY, J. P. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 1–8. DOI 10.1016/j.ecoenv.2014.12.039.

ALMEIDA, D., MARCHINI, L.C., SODRÉ, G. S., D'AVILA, M., ARRUDA, C.M.F. (2003). *Plantas visitadas por abelhas e polinização*. Piracicaba: Esalq, 40p.ISBN 1414-4530.

ANASTASSIADES, M., KOLBERG, D.I., EICHHORN E. WACHTLER, A.K., BENKENSTEIN, A., ZECHMANN S., MACK, D., WILDGRUBE, C., BARTH, A., SIGALOV, I., GÖRLICH, S., DÖRK, D., CERCHIA, G. (2020). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and lc-ms/ms measurement food of plant origin (QuPPe-PO-Method) EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM). Disponível em <[https://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11\(1\).pdf](https://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11(1).pdf)> Acesso em 01/11/2020.

ANASTASSIADES, M., PAYÁ, P., MACK, D., SIGALOVA, I., TASDELEN, B., OLIVA, J., BARBA, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6), 1697–1714. DOI 10.1007/s00216-007-1610-7

ANASTASSIADES M., LEHOTAY, S. J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431. DOI 10.1093/jaoac/86.2.412.

ANVISA. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 296, de 29 de julho de 2019*. Dispõe sobre as informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira. Disponível em <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/%281%29RDC_296_2019_COM_P.pdf/3264ce69-979f-426d-b1da-b6d49f44fdcc> Acesso em 20/02/2020.

ARISSETO-BRAGOTTO, A. P., FELTES, M.M.C., BLOCK, J.M. (2017). Food quality and safety progress in the Brazilian food and beverage industry: chemical hazards. *Food Quality and Safety*, 1, (2), 117–129. DOI 10.1093/fqsafe/fyx009.

BALBINO, V.A., BINOTTO, E., SIQUEIRA, E.S. (2015). Apicultura e responsabilidade social: desafios da produção e dificuldades em adotar práticas social e ambientalmente responsáveis. *REAd | Porto Alegre – Edição 81 - Nº 2 – maio/agosto 2015* – p. 348-377. DOI 10.1590/1413-2311.0442013.44185.

BARGAŃSKA, Z., NAMIEŚNIK, J. (2010). Pesticides analysis of bee and bee products samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(3), 159-171. DOI: 10.1080/10408347.2010.490484.

BARGAŃSKA, B., OLKOWSKA, E., DYMERSKI, T., NAMIEŚNIK, J. (2014). Determination of Pesticide Residues in Honey using the GC×GC-TOFMS Technique. *Journal of Bioprocessing & Biotechnology*, 4, 1-5. DOI 10.4172/2155-9821.1000182.

BOGDANOV, S. (2009). Beeswax: production, properties composition and control. In: S. Bogdanov (Ed.), *Beeswax book* (1-17). Bee Product Science Publishing.

BOGDANOV, S. (2006). Contaminants in bee products. *Apidologie*, 37, 1-8. DOI 10.1051/apido:2005043.

BOGDANOV, S. (2004) Beeswax: quality issues today. *Bee World*, 85(3), 46-50. DOI 10.1080/0005772X.2004.11099623.

BPBES. (2019). Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. [Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services]. Disponível em <https://www.bpb.es.net.br> Acesso em 01/11/2020.

BRADBPEAR, N. (2009). *Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products*. Roma: FAO.

BRASIL. (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução normativa nº 5, de 23 de abril de 2019*. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019. Disponível em

<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/>> Acesso em 30/06/2019.

BRASIL. (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000). *Instrução Normativa nº 11, 20 de outubro de 2000*. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>>. Acesso em 18/08/2019.

BRASIL. (1996). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996*. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.htm> Acesso em 20/02/2020.

BRASIL. (1992). Ministério da Saúde. *Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992*. Disponível em <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html> Acesso em 20/02/2020.

BRASIL. (1989). Presidência da República. *Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989*. Disponível em <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=7802&ano=1989&ato=501MTR61EeFpWT452>> Acesso em 18/06/2019.

BREED, M.D. (2010). Honeybees. In: M. D. Breed & J. Moore. (Eds.), *Encyclopedia of animal behavior* (89-96). Elsevier.

BOVI, T.S. *Toxicidade de inseticidas para abelhas Apis melífera L.* 2013 69f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

CABRERA, L.C., MARTINS, M.L., PRIMEL, E.G., PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. (2012). Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos *Scientia Chromatographica*, 4(3), 227-240 10.4322/sc.2012.013

CALATAYUD-VERNICH, P., CALATAYUD, F., SIMÓ, H., PICÓ, Y. (2018). Pesticide residues in honeybees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*, 241, 106-114. DOI 10.1016/j.envpol.2018.05.062.

CALATAYUD-VERNICH, P., CALATAYUD, F., SIMÓ, H., PICÓ, Y. (2017). Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Science of the Total Environment*, 605–606, 745–754. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.06.174.

CASTILHOS, D., BERGAMO, G.C., GRAMACHO, K.P., GONÇALVES, L.S. (2019a). Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 50(3), 263-272. DOI 10.1007/s13592-019-00642-7.

CASTILHOS, D., DOMBROSKI, J. L. D., BERGAMO, G. C., GRAMACHO, K. P., & GONÇALVES, L. S. (2019b). Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees

associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. *Apidologie*, 50(5), 657–668. DOI 10.1007/s13592-019-00676-x.

CHRISTODOULOU, D.L., KANARI, P., KOUROUZIDOU, O., CONSTANTINOU, M., HADJILOIZOU, P., KIKI, K., CONSTANTINOU, P. (2015). Pesticide residues analysis in honey using ethyl acetate extraction method: validation and pilot survey in real samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(10), 894-910. DOI 10.1080/03067319.2015.1070408.

CODEX ALIMENTARIUS. (2019). Organização Mundial de Saúde. *Standard for Honey Codex Stan 12-1981*. Disponível em <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/en/>>. Acesso em 20/12/2019.

CODEX ALIMENTARIUS. (2016). *Definition pesticides*. Disponível em <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pesticide-mrls/en/>>. Acesso em 24/02/2016.

CODLING, G., AL NAGGAR, Y., GIESY, J.P., ROBERTSON, A.J. (2016). Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere*, 144, 2321-2328. DOI 10.1016/j.chemosphere.2015.10.135.

COLMEIA VIVA. (2017). *Colmeia Viva 2017*. Disponível em <<https://www.colmeiaviva.com.br/>> Acesso em 20/11/2019.

COLOSS. (2020). Honey bee research association. Disponível em <https://coloss.org>

COWELL, J.E., KUNSTMAN, J.L., NORD, P.J., STEINMETZ, J.R., WILSON, G.R. (1986). Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(6), 955-960. DOI 10.1021/jf00072a006.

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J. (2010). Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. In: S. Thany (Ed), *Insect nicotinic acetylcholine receptors* (pp 85-95). Springer.

EC. (2013). European Commission. *Official Journal of the European Communities* 25/05/2013, L 139/12.

EFSA. (2018). European Food Safety Authority. *Neonicotinoids: risks to bees confirmed*.

Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228>> Acesso em 20/02/2020.

EFSA. (2015). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11), 4302, 107 pp. DOI 10.2903/j.efsa.2015.4302.

EFSA. (2013). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal*, 11(1), 3066, 58 pp. DOI 10.2903/j.efsa.2013.3066.

EFSA. (2007). European Food Safety Authority. Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the safety in use of beeswax. *The EFSA Journal*, 615, 1-28. Disponível em <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2007.615>> Acesso em 26/03/2020.

EMBRAPA. (2010). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *O desaparecimento das abelhas melíferas (Apis mellifera) e as perspectivas do uso de abelhas não melíferas na polinização*. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69296/1/Abelha.pdf>> Acesso em 24/02/2016.

EMBRAPA. (2006). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Mel: características e propriedades*. 28p.

EPAGRI. (2020). Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina. Disponível em <<https://ciram.epagri.sc.gov.br/apicultura/apresentacao.html>> Acesso em 01/11/2020.

ERENO, D. (2014). Abelhas vigiadas. *Revista Pesquisa Fapesp*, 221, 70-73. <<https://revistapesquisa.fapesp.br/abelhas-vigiadas/>>. Acesso em 14/01/2019.

FAO. (2020). Food Agriculture Organization. *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)*. Disponível em <https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jmpr/en> Acesso em 20/02/2020.

FAO. (2019). Food Agriculture Organization. *TECA - Technologies and Practices for Small Agricultural Producers*. Disponível em <<http://www.fao.org/teca/categories/beekeeping/en/>>. Acesso em 20/11/2019.

FAO. (2017). Food Agriculture Organization. *FAO no Brasil*. Disponível em <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/901168/>>. Acesso em 20/11/2019.

FAOSTAT. (2020). Food Agriculture Organization. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso em 20/02/2020.

FRATINI, F., CILIA, G., TURCHI, B., FELICOLI, A. (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, (9), 839-843. DOI 10.1016/j.apjtm.2016.07.003.

FREITAS, B.M., PINHEIRO, J.N. (2010). Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, 14(1), 266-281. DOI 10.4257/oeco.2010.1401.16.

FOOD SAFETY. (2018). *Mel: com mercado aquecido, o mundo se preocupa cada vez mais com fraudes*. Disponível em <<https://foodsafetybrazil.org/mel-com-mercado-aquecido-o-mundo-se-preocupa-com-cada-vez-mais-fraudes/>> Acesso em 20/11/2019.

GARCÍA, M.D.G., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., DUQUE, S.U., LOZANO, A.B., SOSA, A. (2017). Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta*, 163, 54-64. DOI 10.1016/j.talanta.2016.10.083.

GBYLIK-SIKORSKA, M., SNIEGOCKI, T. POSYNIK, A. (2015). Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honeybee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 990, 132–140. DOI 10.1016/j.jchromb.2015.03.016.

GIANNINI, T.C., CORDEIRO, G.D., FREITAS, B.M., SAIRAUVA, A.M.M IMPERATIRZ-FONSECA, V.L. (2015). The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *Journal of Economy and Entomology*, 108(3), 849–857. DOI 10.1093/jee/tov093.

GILL, J.P.K., SETHI, N., MOHAN, A., DATTA, S., GIRDHAR, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 1-26. DOI 10.1007/s10311-017-0689-0.

GONÇALVES, L.S., CASTILHOS, D. (2015). Application of the electronic device "BEE ALERT" for registering death of honeybees, stingless bees in general and disappearance of honey bees (CCD) in Brazil. In: International Apicultural Congress, 44. Daejeon, Korea. Scientific Program Abstracts. Daejeon: Apimondia, p.

GONÇALVES, L.S. (2014) O uso dos pesticidas sistêmicos no combate às pragas e seus reflexos nas abelhas: campanha de proteção às abelhas e o aplicativo Bee Alert. In: Libro de Resúmenes del XI Congreso Latinoamericano de Apicultura, 2014-FILAPI. Puerto Iguazu-Misiones, Argentina, 03 a 06 de setembro 2014, p.152013-2017

GONÇALVES, L.S. (2012a) O Desaparecimento das abelhas, suas causas, consequências e o risco dos neonicotinóides para o agronegócio. Mensagem Doce, 117, 2–12. Disponível em <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/117/artigo1.htm>.

GONÇALVES, L.S. (2012b) Consequências do Desaparecimento (CCD) das Abelhas no Agronegócio Apícola Internacional e em especial no Brasil. In: Anais do Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTIAS, C., ROTHERAY, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957. DOI 10.1126/science.1255957.

HARRIET, J., CAMPÁ, J.P., GRAJALES, M., LHÉRITIER, C., PAJUELO, A.G., MENDOZA-SPINA, Y., et al. (2017). Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax. *Chemosphere*, 177, 77-83. DOI 10.1016/j.chemosphere.2017.02.131.

HASHIMOTO, J. C., QUEIROZ, S.C.N., FERRACINI, V.L., ASSALIN, M.R., REYES, F.G.R. (2012). A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified QuEChERS extraction and LC

MS/MS. *Journal of AOAC International*, 95 (3), 913-922. DOI 10.5740/jaoacint.11-140.

HERBERT, L.T., VAÂZQUEZ, D.E., ARENAS, A. FARINA, W.M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behavior. *Journal of Experimental Biology*, 217, 3457-3464. DOI 10.1242/jeb.109520.

HERNANDEZ, F., HIDALGO, C., SANCHO, J. (2000). Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 83, 728-34. DOI 10.1093/jaoac/83.3.728.

IBAMA. (2017). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Disponível em <https://www.gov.br/ibama/pt-br/centrais-de-conteudo/2017-07-25-manual-ibama-ara-abelhas-in0217-web-pdf> Acesso em 01/11/2020.

IBAMA. (2018). Ministério do Meio Ambiente. Comercialização de agrotóxicos. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em 13/07/2018.

IBGE. (2020). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Safra 2019. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>> Acesso em 20/02/2020.

IBGE. (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo Agropecuário*. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em 20/11/2019.

JESCHKE, P., NAUEN, R. (2005). Neonicotinoid Insecticides. In: L.I. Gilbert, K. Iatrou, & S.S. Gill (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 53-105). Elsevier.

KILJANEK, T., NIEWIADOWSKA, A., SEMENIUK, S., GAWEL, M. et al. (2016). Multiresidue method for the determination of pesticides and pesticides metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry-Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A*, 1435, 100-114. DOI 10.1016/j.chroma.2016.01.045.

KRELL, R. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Roma: FAO.

KUJAWSKI, M., BARGANSKA, K., MARCINIAK K., et al. (2014). Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS - Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches. *LWT- Food Science and Technology*, 56 (2), 517-523. DOI 10.1016/j.lwt.2013.11.024.

LACINA, O., ZACHARIASOVA, M., URBANOVA, J., VACLAVIKOVA, M., CAJKA, T., HAJŠLOVA, J. (2012). Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem

mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1262, 8-18. DOI 10.1016/j.chroma.2012.08.097.

LEHOTAY, S.J. (2018). Food safety analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 5329–5330 DOI: 10.1007/s00216-018-1129-0.

LEHOTAY, S.J., COOK, J.M. (2015). Sampling and sample processing in pesticide residue analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4395-4404. DOI 10.1021/jf5056985.

LEHOTAY, S.J., SON, K.A., KWON, H., KOESUKWIWAT, U., FU, W., MASTOVSKA, K. et al. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), 2548-60. DOI 10.1016/j.chroma.2010.01.044.

LEHOTAY, S.J. & Collaborators. (2007). Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of AOAC* 90(2), 485–520, 10.1093/jaoac/90.2.485

LI, Y., KELLEY, R.A., ANDERSON, T.D., LYDY, M.J. (2015). Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honeybees, pollen, and wax by gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 140, 81–87. DOI 10.1016/j.talanta.2015.03.031.

LÓPEZ, D.R., AHUMADA, D.A., DÍAZ, A.C., GUERRERO, J.A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37, 33-40. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.09.011.

LUKE, M.A., FROBERG, J.E., MASUMOTO, H.T. (1975). Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas liquid chromatography. *Journal of AOAC*, 58, 1020-1026.

MALHAT, F.M., HAGGAG, M.N., LOUTFY, N.M., OSMAN, M.A.M., AHMED, M.T. (2015). Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere*, 120, 457–461. DOI 10.1016/j.chemosphere.2014.08.032.

MAPA. (2020). Codex Alimentarius e a participação brasileira no Comitê de Resíduos de Pesticidas. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/hortalicas/anos-anteriores/codex-22.pdf/@download/file/codex-22.pdf> > Acesso em 20/11/2020.

MAPA. (2019). Manual instrutivo do plano nacional de controle de resíduos de contaminantes – PNCRC. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/ManualPNCRCFinalDiagramado.pdf> > Acesso em 01/11/2020.

- MESSAGE, D. 2010. Principais problemas sanitários em apiários no Brasil. CCD (Colony Collapse Disorder) ou desaparecimento das abelhas, in: Congresso Iberolatinoamericano de Apicultura, 10. Natal. CD-ROM
- MURADIAN, L.G., BERA, A. (2007). Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 49–52. DOI 10.1590/S0101-20612007000100009.
- MULLIN, C.A., FRAZIER, M., FRAZIER, J.L., PETTIS, J.S., ASHCRAFT, S. et al. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE* 5(3), e9754. DOI 10.1371/journal.pone.0009754.
- NEGRI, G., MARCUCCI, M.C., SALATINO, A., SALATINO, M.L.F. (2000) Comb and propolis waxes from Brazil: triterpenoids in propolis waxes. *Journal of Apicultural Research*, 39 (1-2), 86-88. DOI: 10.1080/00218839.2000.11101026
- NOVAIS, S.M.A., NUNES, C.A., SANTOS, N.B., DÁMICO, A.R., FERNANDES, G.W., QUESADA, M., BRAGA, R.F., NEVES, A.C.O. (2016). Effects of a possible pollinator crisis on food crop production in Brazil. *PloS ONE* 11(11), E0167292. DOI 10.1371/journal.pone.0167292.
- ORTEGA, P. P.; LÓPEZ, B. G.; REYES, J. F. G.; MARTOS, N. R.; DÍAZ, A. M. (2012). Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1249, 32-40. DOI 0.1016/j.chroma.2012.06.020.
- ORSO, D., ZANELLA, R., FLORIANO, L., RIBEIRO, L.C. et al. (2015). Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9, 1638-1653. DOI 10.1007/s12161-015-0339-8.
- OSÉS, S. M., PASCUAL-MATÉ, A., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A., LÓPEZ-DÍAZ, T. M., SANCHE, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215–1223. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.10.050.
- PANSERI, S., CHIESA, L.M., CATALANO, A., GIORGI, A. et al. (2014). Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*, 38, 150-156. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.10.024.
- PAREJA, L., JESÚS, F., HEINZEN, H., HERNANDO, M.D., RAJSKI, L., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2019). Evaluation of glyphosate and AMPA in honey by water extraction followed by ion chromatography mass spectrometry. A pilot monitoring study. *Analytical Methods*, 11, 2123-2128. DOI 10.1039/C9AY00543A.
- PERES, F., MOREIRA, J. C., DUNOIS, G. S. (2003). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PINTO, C.T., PANKOWSKI, J. A., NANO, F.E. (2017). The anti-microbial effect of food wrap containing beeswax products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7, 2017, 145-148. DOI 10.15414/jmbfs.2017.7.2.145-148.

PIRES, C.S.S., PEREIRA, F.M., LOPES, M.T.R., NOCELLI, R.C.F., MALASPINA, O., PETTIS, J.S., TEIXEIRA, E.W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa. Agropecuária Brasileira*, 51 (5), 422–442. DOI 10.1590/S0100-204 X2016000500003

PRESTES, O.D, ADAIME, M.B., ZANELLA, R. (2011). QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 51-64. DOI 10.4322/sc.2011.004.

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. (2009). QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, 32 (6), 1620-1634. DOI 10.1590/S0100-40422009000600046.

REJCZAK, T., TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 13, 2015, 980-1010. DOI 10.1515/chem-2015-0109.

RISSATO, S.R., GALHIANE, M.S., ALMEIDA, MV., GERENUTTI, M. & APON, B.M. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101, 2007, 1719-1726. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.10.034.

RODRIGUES, N.R., SOUZA, A.P.F. (2018). Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(4), 723-730. DOI 10.1080/19440049.2017.1419286.

RUBIO, F., GUO, E., KAMP, L. (2014). Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *Environmental Analytical and Toxicology*, 4, 2014, 249. DOI 10.4172/2161- 0525.1000249.

SANTE. (2018). European commission directorate general for health and food safety. *Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed* (SANTE/11813/2017). Disponível em <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf> Acesso em 01/01/2020.

SANTOS, M. A. T., AREAS, M.A., REYES, F.G.R. Piretróides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição*, 18 (3), 2007, 339–349.

SANTOS, V.M.R., DACOSTA, J.B.N., CAIXEIRO, J.M.R., DONNICI, C.L. (2007). Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, 30 (1), 159-170. DOI 10.1590/S0100-40422007000100028.

- SHENDY, A.H., AL-GHOBASHY, M.A., ALLA, S.A.G., LOTFY, H.M. (2016). Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. *Food Chemistry*, 190, 982-989. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.06.048.
- SILVA, P.M., GAUCHE, C., GONZAGA, L.V., COSTA, A.C.O., FETT, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.
- SILVA, R.A., MAIA, G.A., SOUSA, P.H.M., COSTA, J.M.C. (2006). Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. *Alimentos e Nutrição*, 17 (1), 113-120.
- SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., BONMATIN, J. M., CHAGNON, M., DOWNS, C., FURLAN, L., GIBBONS, D. W., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., et al. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1), 5–34. DOI 10.1007/s11356-014-3470-y.
- TAPPARO, A., GIORIO, C., SOLDÀ, L., BOGIALLI, S., MARTON, D., MARZARO, M., GIROLAMI, V. (2013). UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 405, 1007–1014. DOI 10.1007/s00216-012-6338-3.
- TETTE, P.A., FERNANDES, C., OLIVEIRA, F.A.S., PEREIRA, E.N.C. et al. (2016). Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 211, 130-139. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.05.036.
- THOMPSON, T.S., VAN DER HEEVER, J.P., LIMANOWKA, R.E. (2019). Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants.: Part A*, 36 (3), 434-446. DOI 10.1080/19440049.2019.1577993.
- USDA. (2020a). ARS Honey Bee Health. Disponível em <https://www.ars.usda.gov/oc/br/ccd/index/#reports>
- USDA. (2020b). Honey Bee Colonies. Disponível em <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/rn301137d?locale=en> Acesso em 01/11/2020.
- USDA. (2015). United States Department of Agriculture. *Bee Survey: Lower Winter Losses, Higher Summer Losses, Increased Total Annual Losses*. Disponível em <https://www.ars.usda.gov/news-events/news/research-news/2015/bee-survey-lower-winter-losses-higher-summer-losses-increased-total-annual-losses> Acesso em 01/11/2020.
- WILLIAMS, G. R., TROXLER, A., RETSCHINIG, G., ROTH, K., YANEZ, O., SHUTLER, D., NEUMANN, P., GAUTHIER, L. (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports*, 5, 14621. DOI 10.1038/srep14621.

ZHANG, J. M.; WU, Y. L.; YAO-BIN LU, Y. B. (2013). Simultaneous determination of carbamate insecticides and mycotoxins in cereals by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure. *Journal of Chromatography B*, 915-916, 13-20. DOI 10.1016/j.jchromb.2012.

ZOLLER, O. RHYN, P., RUPP, H., ZARN, J.A. GEISER, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 83-91. DOI 10.1080/19393210.2017.1419509.

CAPÍTULO 2

**Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in Brazilian beeswax
by gas chromatography-tandem mass spectrometry and pesticide hazard
evaluation**

Submetido ao Journal of Apicultural Research

**Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in Brazilian beeswax
by gas chromatography-tandem mass spectrometry and pesticide hazard
evaluation**

Ana Paula Ferreira de Souza^{a,b}, Nadia Regina Rodrigues^b, Amadeo Rodríguez
Fernández-Alba^c and Felix Guillermo Reyes Reyes^a

^a Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas,
Campinas, SP, Brazil.

^b Analytical Chemistry Division, CPQBA, University of Campinas, Campinas, SP,
Brazil.

^c European Union Reference Laboratory for Pesticide Residue in Fruit & Vegetables,
University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Almeria,
Spain.

*Corresponding Author: Ana Paula Ferreira de Souza

Phone.: + 55 19 21392870

E-mail: anasouza@cpqba.unicamp.br

ORCID

Ana P. F. Souza: <https://orcid.org/0000-0002-7870-4409>

Nadia R. Rodrigues: <https://orcid.org/0000-0002-5524-9781>

Amadeo R. Fernández-Alba: <https://orcid.org/0000-0002-9715-3489>

Felix G. R. Reyes: <https://orcid.org/0000-0003-0126-3817>

Abstract

Beeswax is known for its ability to retain pesticides for a long time, and the progressive accumulation of pesticides in wax has had adverse health effects on bees. This study aimed to determine the residue levels of pesticides in Brazilian beeswax and assess the health risk to the bees due to exposure to these pesticides using the hazard quotient calculation. Nineteen samples collected from different regions from Sao Paulo State were analyzed for the presence of 160 pesticides and some metabolites. A modified QuEChERS approach was used for sample preparation followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS-MS) analysis. The method validation parameters followed the requirements established by the EU SANTE 11813/2017 guideline. In 90% of the samples, one or more pesticide residues were found; among them, the most frequently found pesticides were chlorpyrifos and permethrin, which were in 74% and 79% of the samples and had maximum levels of 18.6 ng g⁻¹ and 72 ng g⁻¹, respectively. The exposure risk estimate was determined considering the acute lethal dose (LD₅₀) per contact for each pesticide residue in beeswaxes. Thus, it has been shown that exposure to chlorpyrifos and permethrin represents an elevated risk for the health of bees.

Key-words: beeswax, pesticide residues, multiresidue analysis, QuEChERS, GC-MS/MS, hazard quotient, chlorpyrifos, permethrin.

Introduction

Beeswaxes are complex matrices that contain more than 300 different substances, mainly saturated and unsaturated hydrocarbons and saturated long-chain mono- and di-unsaturated esters. Other components of beeswaxes are free hydroxy acids, free aliphatic alcohols and carotenoids. The bees use the wax to develop the cells where they will store honey and pollen to feed the larvae (Bogdanov, 2009). The decrease in the number of Brazilian honeybee colonies in recent years, which is mainly due to the extensive use of pesticides, has affected the production of not only honey but also wax (Castilhos et al., 2019).

Beeswax is known for its ability to retain pesticides for a long time, and the progressive accumulation of pesticides in wax has had adverse effects on bees, especially on individuals at different stages of development, and has affected the survival and viability of hives (Benuszek et al., 2017; Bogdanov, 2009; dos Santos et al., 2018; Sanchez-Bayo & Goka, 2016).

Agricultural practices expose bees to a large variety of pesticides during their search for nectar, water and pollen. The suspended particles may be trapped in their bodies or inhaled. Some of these substances can be metabolized, but others can accumulate in bee products such as beeswax (Breed, 2010; Harriet et al., 2017; Novais et al., 2016). Given the persistence and lipophilic nature of several molecules insecticides such as acrinathrin, amitraz, coumaphos and τ -fluvalinate and chlorpyrifos used in crop protection are the most commonly found substances in beeswax (Benuszek et al., 2017; Orantes-Bermejo et al., 2010).

The contamination of bee products has been extensively investigated, but only 8.7% of the existing reports are related to beeswax. Beeswax contamination by pesticide

residues has mainly been reported in Europe and North America (Benuszak et al., 2017; Orantes-Bermejo et al., 2010; Valdovinos-Flores et al., 2017).

A study conducted in Belgium with ten beeswax samples found bromopropilate, τ -fluvalinate and coumaphos residues in 100%, 90% and 70% of the samples, respectively (Ravoet et al., 2015). Mullin et al. (2010) reported that almost 98% of North American beeswax samples (n=749) were contaminated with 87 types of pesticides and metabolites, including τ -fluvalinate and coumaphos. Different residues of xenobiotics such as atrazine, tebuconazole, azoxystrobin, coumaphos and τ -fluvalinate were detected in beeswax from Uruguay (Harriet et al., 2017). In Italy, Perugini et al. (2018) conducted studies in 2013-2015 and recurrently detected levels of coumaphos and τ -fluvalinate in wax samples.

Only a few methods have been reported in the literature for the multiclass multiresidue quantitation of pesticide residues in beeswax. Among them, the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, robust and safe) sample preparation procedure has been demonstrated to be very effective (Calatayud-Vernich et al., 2017; Harriet et al., 2017). Methods using either liquid (LC) or gas (GC) chromatography for the analytes separation and mass spectrometry (MS) as detection techniques have been reported for the multiresidue analysis of pesticides such as acaricides or lipophilic compounds (Calatayud-Vernich et al., 2018; García et al., 2017; Niell et al., 2014;). Calatayud-Vernich et al. (2017) studied waxes of Spanish origin and reported a higher risk associated with the exposure to acrinathrin in waxes that were used as the foundation of hives and chlorpyrifos in old combs. Harriet et al. (2017) studied the risk of exposure to pesticides through beeswax in Uruguay and found that chlorpyrifos was a major contributor to the hazard quotient (HQ) score, followed by coumaphos. Calatayud-Vernich et al. (2018) assessed the risk of exposure through wax and pollen, and

confirmed that acrinathrin residues had a high contribution to the HQ scores for pollen and wax.

Considering the advantages of the QuEChERS sample preparation approach associated with GC-MS in tandem (GC-MS/MS), a method of analysis was validated for the simultaneous quantitation of pesticide residues ($n = 160$) with a wide polarity range ($\log K_{OW} = 0.85-6.9$) by García et al (2017) and it was used to analyze samples of beeswax ($n = 19$) from different Brazilian regions from Sao Paulo State to evaluate a wide scope of agrochemicals that could contaminate beeswax. Next, the potential toxicity of the pesticides residues in the beeswax to bees was estimated by calculating the risk quotient (HQ) using the bee LD_{50} value per contact for each pesticide. As far as we know, this is the first study that reports a multiclass, multiresidue analytical method to quantitate of pesticide residues in beeswax that uses QuEChERS and GC-MS/MS as well as assesses the health risk to the bees caused by the presence of these substances in the wax in our country.

Materials and methods

Chemicals and solutions

All high-purity (purity higher than 98%) pesticide standards were obtained from LGC (Teddington, United Kingdom), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and stored at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Individual pesticide stock solutions ($1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in acetonitrile and stored in amber screw-capped glass vials in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) of mass spectrometry (MS) degree were purchased from Fluka Analytical (Steinheim, Germany). Ammonium formate (NH_4HCO_2), formic acid (H_2CO_2), anhydrous magnesium sulphate (MgSO_4), sodium chloride (NaCl), di-sodium

hydrogen citrate sesquihydrate ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Na}_4\text{O}_{17}$) and sodium citrate tribasic dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). PSA sorbent was supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Ultra-purified water was obtained from a Milli-Q water system (Massachusetts, USA) with a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Samples

In total, 19 beeswax samples were randomly collected from different areas in the State of São Paulo, Brazil, in 2018. The samples were kept in individual plastic packages at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

Sample preparation

A modified QuEChERS method, which was published by García et al. (2017), was performed for sample preparation. In summary, a homogenized sample (10.0 g) was weighed in a 50-mL polytetrafluoroethylene (PTFE) centrifuge tube. Then, 10.0 mL of ACN was added to the tube, and the mixture was shaken in an automatic axial extractor for 4 min. Next, MgSO_4 (4 g), NaCl (1 g), $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g) and $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Na}_4\text{O}_{17}$ (0.5 g) were added to the tubes, and the mixtures were shaken in the automatic axial extractor for 5 min at a constant temperature of $40 \text{ }^\circ\text{C}$ and then centrifuged ($\text{RCF } 2.500 \text{ g}$) for 5 min. An 5.0 mL aliquot of the supernatant was transferred to a 15-mL PTFE centrifuge tube that contained MgSO_4 (750 mg) and PSA (125 mg). The samples were shaken in a vortex for 30 s and centrifuged again ($\text{RCF } 2.500 \text{ g}$) for 5 min. The extracts were transferred to an amber vial and acidified with $10 \text{ }\mu\text{L}$ per mL of extract with a solution of acetonitrile with 5% formic acid. An aliquot of $100 \text{ }\mu\text{L}$ was transferred to an

amber vial and evaporated under a gentle N₂ flow; then, the dry extract was resuspended with ethyl acetate.

Analytical instrumentation

Analyses were performed using an Agilent Technologies Intuvo 9000 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA), which was equipped with a 7693 autosampler, split/splitless injector and 7010 tandem mass spectrometry detector triplo quadrupole. Chromatographic separation was achieved on two planar HP-5MS columns (15 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness, Agilent, USA) and a guard chip as the precolumn. The following oven temperature program was used: the initial temperature of 60 °C was maintained for 0.5 min, increased to 170 °C at 40 °C min⁻¹, and increased to 310 °C at 10 °C min⁻¹ plus 2 min to post run. The total run time of the chromatographic analysis was 12.4 min. The injector program was set at 80 °C, maintained for 0.1 min and subsequently increased to 300 °C at 60 °C min. The carrier gas was helium with constant flow rates of 1.3 mL min⁻¹ for column 1 and 1.5 mL min⁻¹ for column 2. The injection volume was 2 µL in the splitless mode. The MS/MS system with electron ionization (EI) high-efficient ion source (HES) was used for the mass spectrometric analysis. The temperatures of the transfer line, ion source and quadrupole 1 and 2 were 280 °C, 280 °C and 150 °C, respectively.

Quality assurance and Quality control

Method validation and performance to quantitate residues were conducted in accordance with SANTE 11813/2017 guideline (SANTE, 2018). The validation procedure was described by García et al. (2017). In summary, the linearity was evaluated by assessing the signal responses of the target analytes in both solvent and

honey beeswax comb extract at six concentration levels (1 to 1000 ng g⁻¹). Matrix effects (ME) were evaluated by comparing the slopes of the analytical curves obtained in the solvent and in the matrix for each analyte. The accuracy (as recovery) and precision of the extraction method were determined at two concentration levels: 10 ng g⁻¹ (20 ng g⁻¹ for 3,5-dichloroaniline and chlordane) and 50 ng g⁻¹. The MQL was set as the lowest concentration which provides a correct SRM ratio and can be quantified with an acceptable accuracy and precision according the SANTE guideline.

In this study, to quality control were used the internal standard (IS) triphenylphosphate (TPP), dichlorvos-*d*₆ and malathion-*d*₁₀ added to the sample at a concentration of 10 ng g⁻¹ prior to the extraction procedure to record the possible losses that occurred during the sample preparation and GC-MS/MS analysis. The IS lindane-*d*₆ was added to the final extract at 25 ng g⁻¹ prior to the GC injection as a quality control for the GC-MS/MS system. In addition, one blank solvent and one blank beeswax sample were analyzed in each batch to ensure that no contamination occurred during the sample preparation or instrumental analysis. The injector liner was changed after every 25 injections.

The residues were identified based on the criteria established in the SANTE 11813/2017 guideline (SANTE, 2018). The requirements include: the detection of two overlapping transitions with the same peak shape and a signal-to-noise ratio above 3; a retention time tolerance of ± 0.1 min compared with the standard in the solvent; an ion ratio (SRM2/SRM1) compliance of $\pm 30\%$ of the average of the calibration standards from the same sequence.

Beeswax toxicity

The hazard quotient (HQ) was calculated as an estimate of toxicity using Equation 1 (IBAMA, 2017; Calatayud-Vernich et al., 2018; Sanchez-Bayo & Goka, 2016). Toxicity data were obtained from Sanchez-Bayo and Goka (2014). In this approach, we used the contact LD₅₀ values to estimate the HQ as a function of the pesticide concentration in the waxes.

$$HQ = \frac{\text{pesticide concentration}_{ng\ g^{-1}}}{LD_{50} (\mu g\ bee^{-1})} \quad \text{Equation (1)}$$

Results

The parameters to identify and quantitate the pesticide residues in beeswax by GC-MS/MS are shown in Table 1. The detection and identification of chlorpyrifos, diazinon and permethrin in the Brazilian beeswax extract in accordance with the SANTE 11813/2017 (SANTE, 2018) criteria are shown in Figure 1.

Table 1. List of pesticides evaluated in this study and mass spectrometric conditions for the GC-MS/MS analysis.

	Pesticide	Type	tr(min)	SRM1	CE ₁ (eV)	SRM2	CE ₂ (eV)
1	2,4-DDE	metabolite	7.12	246>176	30	246>211	20
2	2,4-DDT	insecticide	12.21	235>165	20	235>199	15
3	4,4-DDD	metabolite	7.81	235>165	20	235>199	15
4	4,4-DDE	metabolite	7.41	246>176	30	246>211	20
5	4,4-DDT	insecticide	8.16	235>165	20	235>199	20
6	3,5-Dichloroaniline	metabolite	3.96	161>99	25	161>90	20
7	3-Chloroaniline	metabolite	3.28	127>92	15	127>100	10
8	Acrinathrin	acaricide	9.19	208>181	5	209>141	20
9	Alachlor	herbicide	6.13	188>160	10	188>130	40
10	Aldrin	insecticide	6.54	293>186	40	293>257	8
11	Ametryn	herbicide	6.12	227>185	5	227>212	8
12	Atrazine	herbicide	5.37	215>58	10	215>173	5
13	Benalaxyl	fungicide	8.07	148>105	20	204>176	2
14	Bifenox	herbicide	8.77	311>279	14	311>216	25
15	Bifenthrin	insecticide	8.59	181>166	10	181>115	50
16	Biphenyl	fungicide	3.90	154>102	40	154>126	40
17	Bixafen	fungicide	10.45	159>139	15	413>159	12
18	Boscalid	fungicide	10.15	140>112	10	140>76	25
19	Bromopropilate	acaricide	8.62	341>185	20	341>155	20
20	Butralin	herbicide	6.65	266>174	20	266>190	12
21	Butylate	herbicide	4.02	156>57	5	174>146	3
22	Cadusafos	insecticide	5.11	159>97	10	213>73	10
23	Carbophenothion	insecticide	8.05	199>143	10	342>157	10
24	Chinomethionate	fungicide	7.12	234>206	10	206>148	15
25	Chlorbromuron	herbicide	3.97	233>124	25	233>205	12
26	Chlordane	insecticide	7.20	373>266	20	373>301	10
27	Chlorfenapyr	insecticide	7.61	247>227	15	247>200	25
28	Chlorfenvinphos	acaricide	6.89	267>159	20	267>81	40
29	Chlorobenzilate	acaricide	7.71	139>111	15	139>75	30
30	Chlorothalonil	fungicide	5.78	266>231	20	266>133	40
31	Chlorpropham	herbicide	4.92	213>171	5	213>127	5
32	Chlorpyrifos	insecticide	6.51	313>258	15	313>286	5
33	Chlorpyrifos-Methyl	insecticide	6.07	288>93	26	286>271	16
34	Chlorthal-Dimethyl	herbicide	6.57	330>299	12	330>221	35
35	Chlozolinate	fungicide	6.83	259>188	10	331>216	5
36	Coumaphos	insecticide	9.68	210>182	10	362>109	15
37	Cyfluthrin	insecticide	9.90	163>127	5	226>206	10
38	Cypermethrin	insecticide	10.06	163>127	5	209>141	20
39	Deltamethrin	insecticide	11.33	253>93	20	253>172	5
40	Desmethyl-Pirimicarb	insecticide	5.91	152>96	12	224>152	8
41	Diazinon	insecticide	5.58	304>179	15	137>84	15
42	Dichlofluanid	fungicide	6.41	224>123	8	167>124	5
43	Dichlorvos	insecticide	3.39	185>93	15	185>109	15
44	<i>Dichlorvos-d6</i>	IS	3.38	191>99	15	191>115	20
45	Diclobutrazol	fungicide	7.73	270>159	15	270>201	8
46	Dicloran	fungicide	5.34	206>176	5	206>148	20
47	Dicofol	acaricide	10.16	139>111	10	250>139	8
48	Dieldrin	insecticide	7.49	279>243	8	345>263	8
49	Dimethenamid	herbicide	6.01	230>154	10	154>111	10
50	Diphenylamine	fungicide	4.84	169>77	35	168>140	40
51	Disulfoton	insecticide	5.70	142>109	5	142>81	12
52	Disulfotonsulfoxide	insecticide	3.67	125>97	3	212>153	15
53	DMST	metabolite	2.88	106>79	8	214>106	15
55	Endosulfanalalpha	insecticide	7.25	239>204	15	241>206	25
55	Endosulfanbeta	insecticide	7.79	241>206	14	239>204	15
56	Endosulfan sulfate	metabolite	8.21	387>289	5	387>206	40

57	Endrin	insecticide	7.71	263>193	35	263>228	25
58	EPN	insecticide	8.64	157>77	25	157>110	15
59	Ethofumesate	herbicide	6.32	207>161	5	207>137	10
60	Ethoxyquin	insecticide	5.32	202>174	15	202>159	30
61	Etofenprox	insecticide	10.26	163>107	15	163>135	5
62	Etrimfos	insecticide	5.73	292>181	5	292>153	20
63	Fenamidone	fungicide	8.74	268>180	20	238>103	20
64	Fenchlorphos	insecticide	6.21	285>270	18	285>240	30
65	Fenitrothion	insecticide	6.13	277>260	5	277>109	20
66	Fenpropathrin	inseticide	8.67	181>152	26	265>210	10
67	Fenthion	insecticide	6.49	278>109	20	278>169	20
68	Fipronil	insecticide	6.87	213>178	10	213>143	20
69	Fenvalerate/Esfenvalerate RR/SS	insecticide	10.73	167>125	12	125>89	22
70	Fenvalerate/Esfenvalerate RS/SR	insecticide	10.96	167>125	12	125>89	22
71	Fipronil-Desulfinil	metabolite	6.08	388>333	20	333>281	15
72	Fipronil-Sulfone	metabolite	7.45	383>255	20	383>213	25
73	Flamprop-Isopropyl	herbicide	7.75	276>105	5	304>105	12
74	Flamprop-Methyl	herbicide	7.45	276>105	8	230>170	15
75	Fluacrypirim	fungicide	7.87	145>102	30	145>115	15
76	Fluazifop-p-Butyl	herbicide	7.57	282>91	15	282>238	20
77	Flucytrinate	insecticide	10.30	199>157	5	157>107	15
78	Fludioxonil	fungicide	7.35	248>127	30	248>154	25
79	Fluopicolide	fungicide	8.17	209>182	20	173>109	25
80	Fluquinconazole	fungicide	9.69	340>298	20	340>286	30
81	Flutolanil	fungicide	7.27	323>173	13	323>281	4
82	Fluvalinate-tau	insecticide	10.89	250>55	18	250>200	22
83	Fonofos	insecticide	5.59	137>109	5	246>137	5
84	Formothion	acaricide	5.87	170>93	5	224>125	20
85	HCB	fungicide	5.33	284>249	25	284>214	40
86	HCH-alpha	metabolite	5.25	219>183	5	219>145	25
87	HCH-beta	metabolite	5.47	219>183	10	219>145	25
88	Heptachlor	insecticide	6.20	272>237	10	272>143	40
89	Heptachloroepoxide-cis	metabolite	6.90	217>182	22	183>119	25
90	Heptachloroepoxide-trans	metabolite	6.94	183>155	15	183>119	30
91	Heptenophos	insecticide	4.63	124>89	15	215>200	10
92	Iprodione	fungicide	8.41	314>245	10	314>56	20
93	Isazofos	nematicide	5.72	161>119	5	257>162	5
94	Isocarbophos	insecticide	6.68	136>108	14	230>212	8
95	Isofenphos-Ethyl	insecticide	6.88	213>121	15	213>185	3
96	Isofenphos-Methyl	insecticide	6.75	199>121	10	199>167	10
97	Isoprothiolane	fungicide	7.33	162>85	15	162>134	5
98	Isopyrazam	fungicide	9.38	159>139	10	359>303	8
99	Lambda-Cyhalothrin	insecticide	9.09	197>141	10	197>161	5
100	Lindane	insecticide	5.47	219>183	5	181>145	12
101	<i>Lindane-d6</i>	IS	5.50	224>187	5	224>150	20
102	Malathion	insecticide	6.37	173>99	15	158>125	8
103	<i>Malathion-d10</i>	IS	6.34	183>132	5	183>151	3
104	Mecarbam	acaricide	6.88	159>131	5	329>160	3
105	Mepanipyrim	fungicide	7.17	223>207	30	222>179	30
106	Merphos	defoliant	7.38	169>57	8	169>113	3
107	Metazachlor	herbicide	6.82	209>133	10	133>117	25
108	Metconazole	fungicide	8.80	125>89	20	125>99	20
109	Methidathion	insecticide	7.08	145>85	5	145>58	15
110	Methiocarb	insecticide	6.30	168>153	10	153>109	10
111	Methoxychlor	insecticide	8.67	227>169	25	227>115	40
112	Metolachlor	herbicide	6.49	238>162	8	162>133	12
113	Mevinphos	insecticide	3.99	127>109	10	127>95	15
114	Molinate	herbicide	4.51	126>55	12	126>83	3

115	Napropamide	herbicide	7.30	128>72	3	271>128	3
116	Nuarimol	fungicide	8.30	203>107	10	235>139	12
117	Ofurace	insecticide	8.04	232>158	20	232>186	5
118	Ortophenylphenol	fungicide	4.45	170>141	30	170>115	40
119	Oxadixyl	fungicide	7.85	163>132	15	163>117	25
120	Parathion-Methyl	insecticide	5.67	263>109	10	233>124	10
121	Pebulate	herbicide	4.13	128>57	5	161>128	3
122	Pentachloroaniline	metabolite	5.97	263>192	25	263>227	15
123	Permethrin	insecticide	9.52	163>127	5	183>153	15
124	Phorate	acaricide	5.15	231>129	20	231>175	20
125	Phorate-Sulfone	metabolite	6.47	153>97	10	199>143	8
126	Phosmet	insecticide	8.63	160>77	30	160>133	15
127	Phthalimide	metabolite	4.17	147>103	5	147>76	30
128	Picolinafen	herbicide	8.62	238>145	25	376>238	25
129	Picoxystrobin	fungicide	7.20	335>173	10	303>157	15
130	Procymidone	fungicide	6.99	283>96	8	283>255	8
131	Prometon	herbicide	5.31	225>183	3	225>168	10
132	Prometryn	herbicide	6.14	241>184	12	241>226	8
133	Propaphos	insecticide	7.04	220>140	12	220>125	25
134	Propazine	herbicide	5.40	214>172	8	229>187	3
135	Prosulfocarb	herbicide	6.20	128>86	3	251>128	5
136	Prothiophos	insecticide	7.34	309>239	15	309>221	25
137	Pyrazophos	fungicide	9.24	221>193	10	221>149	15
138	Pyridaben	acaricide	9.63	147>117	20	147>132	10
139	Pyrifenox	herbicide	7.11	262>227	10	262>200	20
140	Pyriproxyfen	larvicide	8.98	136>78	18	136>96	8
141	Quinalphos	insecticide	6.87	146>91	30	157>129	15
142	Quintozene	fungicide	5.58	295>237	15	295>265	10
143	Spirodiclofen	acaricide	9.57	312>259	10	312>109	20
144	Spiromesifen	acaricide	8.51	272>254	3	272>209	12
145	Sulfotep	insecticide	5.07	202>146	10	238>146	10
146	Sulprofos	insecticide	7.95	156>141	15	322>156	10
147	Tebuconazole	fungicide	8.29	250>125	20	250>153	12
148	Tebufenpyrad	insecticide	8.70	333>171	20	333>276	5
149	Tecnazene	fungicide	4.81	215>179	12	203>143	20
150	Tefluthrin	insecticide	5.64	177>127	15	177>137	15
151	Terbufos	insecticide	5.52	231>129	25	231>175	10
152	Terbumeton	herbicide	5.41	169>154	5	225>169	3
153	Terbutryn	herbicide	6.28	241>185	3	241>170	10
154	Tetrachlorvinphos	insecticide	7.15	329>109	25	329>79	35
155	Tetradifon	insecticide	8.89	356>159	10	356>229	10
156	Tetrahydrophthalimide	metabolite	4.26	151>80	5	151>122	8
157	Tetramethrin	insecticide	8.60	164>77	30	164>107	15
158	Tolclofos-Methyl	fungicide	6.13	265>250	15	265>220	25
159	Tolylfluanid	fungicide	6.88	137>91	20	238>137	10
160	TPP	IS	8.32	326>233	10	326>169	35
161	Triadimefon	fungicide	6.54	208>181	5	208>127	15
162	Triazophos	acaricide	7.94	161>134	5	161>106	10
163	Trifluralin	herbicide	4.98	306>264	10	264>160	15
164	Vinclozolin	fungicide	6.05	212>172	15	212>109	40

IS = internal standard, tR(min) = retention time, SRM1 = Selected reaction monitoring 1, CE1(eV) = collision energy 1, SRM2 = Selected reaction monitoring 2, CE2(eV) = collision energy 2

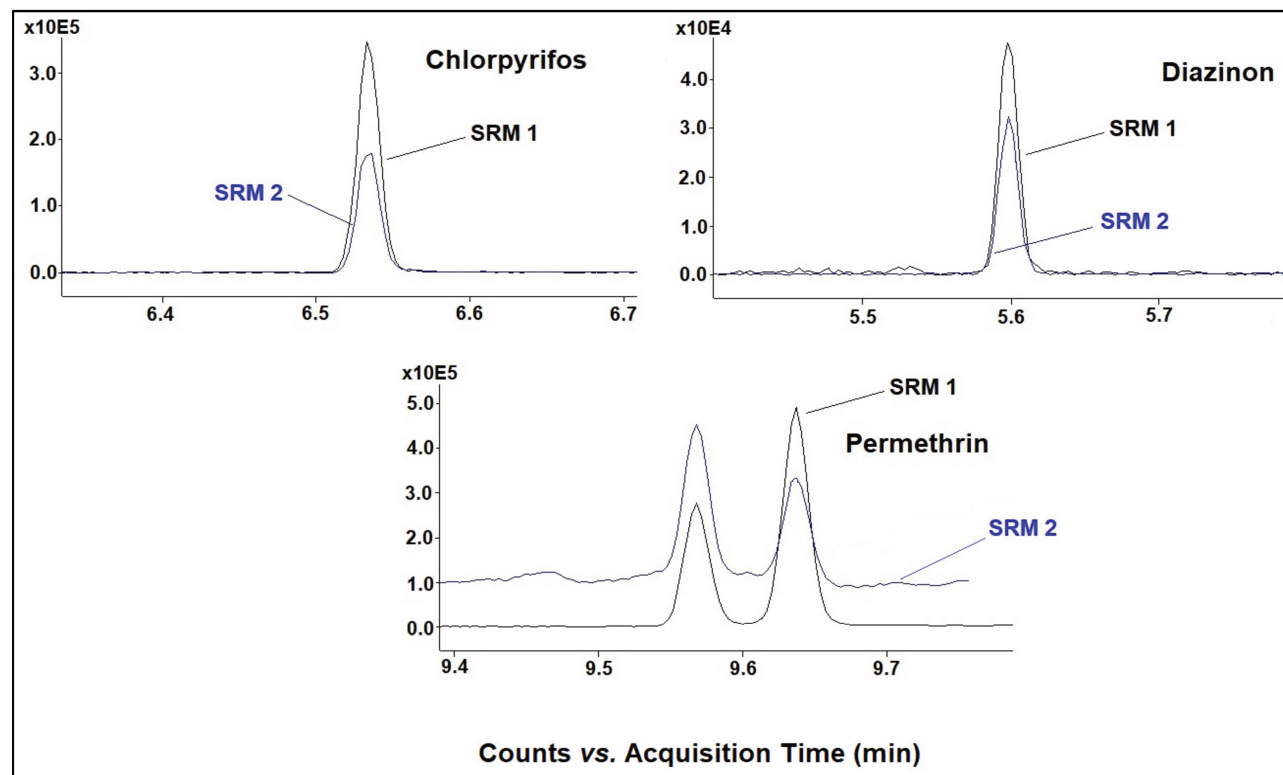


Figure 1. Representative Extracted Ion Chromatograms (EIC) obtained from beeswax samples contaminated with chlorpyrifos (SRM 1: 314>258; SRM 2: 314>286; ion ratio 99.7%), diazinon (SRM 1: 137>84; SRM 2: 304>179; ion ratio 92.8%) and permethrin (SRM 1: 163>127; SRM 2: 183>153; ion ratio 126.3%) residues.

Pesticide residues were detected in 89% of the analyzed samples. Among the detected pesticide residues, chlorpyrifos and permethrin were detected above the MLQ in 79% and 74% of the analyzed samples, respectively. The presence of diazinon was verified in one (5%) of the analyzed samples, but it was below the MQL. These pesticide residues are permitted to be used as insecticides/acaricides (Table 2).

Table 2. Summary of pesticide (insecticide) residues in Brazilian beeswax.

Pesticide	Chemical class	Positive samples	Frequency (%)	Concentration range (ng g ⁻¹)	Average concentration (ng g ⁻¹)**
Diazinon	Organophosphate	1	5	< MQL*	-
Chlorpyrifos	Organophosphate	14	74	MQL -18.6	< MQL
Permethrin	Pyrethroid	15	79	MQL -72.2	12.5

* Identified, but lower than the method quantitation limit (MQL = 10 ng g⁻¹); **To calculate the average concentration values below the MQL, but detectable were considered half-MQL (McBean & Rovers, 1984).

Co-occurrence of two pesticide residues (chlorpyrifos and permethrin) were detected in 58% of the analyzed samples. Three pesticides in the same sample only occurred once, representing 5% of the analyzed samples. Thus, combinations of chlorpyrifos, diazinon and permethrin pesticide residues occurred in the beeswax at an average total pesticide concentration of nearly 11.5 ng g⁻¹.

In estimating the potential risk that waxes pose to bees, only results above MQL were considered. The risk quotient (HQ) (Equation 1) was calculated for each pesticide in each sample. The HQ greater than 250 points is considered relevant. Samples with HQ above 5,000 points should be considered to have a high risk to the health of bees (Calatayud-Vernich et al., 2018).

In this study, the samples had HQs of 150-1146 points, and five samples had relevant toxicity to honeybees with HQ values over 250 points (Figure 2).

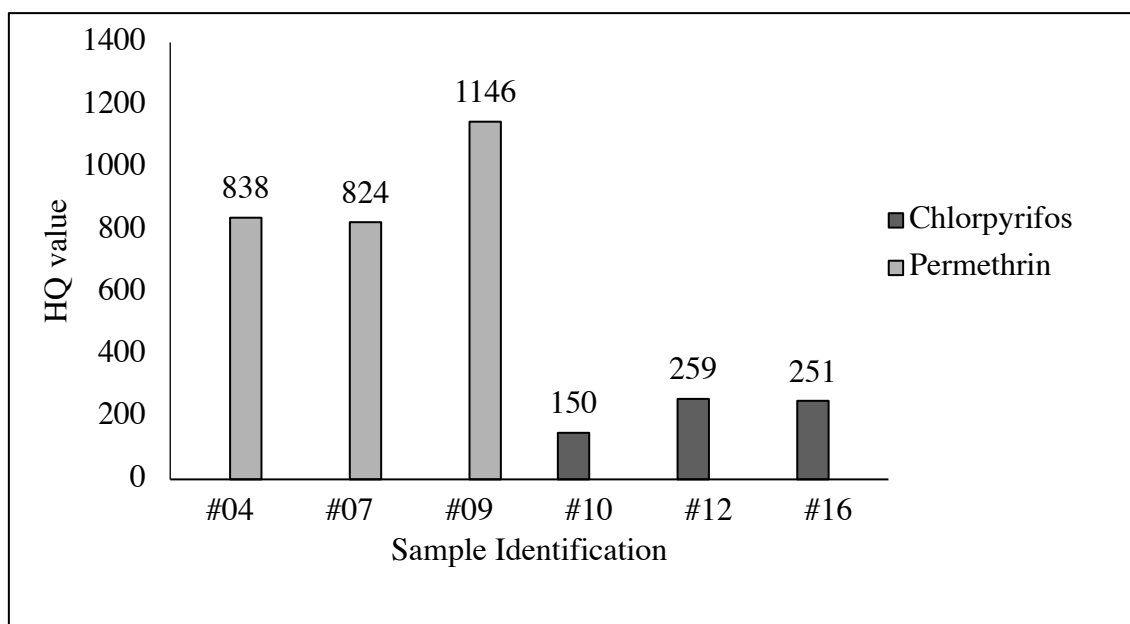


Figure 2. Contribution to the hazard quotient (HQ) of each pesticide quantitated in Brazilian beeswax.

Discussion

A multiresidue, multiclass gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) analytical method reported by García et al. (2017) was validated for the quantitative analysis of pesticide ($n = 160$; including acaricides, insecticides, fungicides, herbicides and some degradation products) residues in honeybee wax combs. The wax combs analyzed by García et al. (2017) included wax, honey, pollen and, in some cases, larvae; We applied this method in our study, and only wax was analyzed.

The analyzed pesticide compounds were selected from the European Union and Brazil database among authorized or prohibited compounds. They are mainly used in agriculture as plant protection (PPP), and some of them are also used as veterinary drugs against Varroa mite in the EU and horn fly in Brazil (EU, 2019; AGROFIT, 2020).

The QuEChERS sample preparation approach combined with the use of sorbents in the dispersive solid phase extraction (d-SPE) stage enables the analysis of multiclass and

multiresidue pesticides in different matrices. However, because some pesticides have less stability or lower recovery depending on the pH of the matrix, the use of buffers during extraction is recommended (Lehotay et al., 2010). Chlorothalonil, dicofol and tolyfluanid pesticides are sensitive and unstable under basic pH conditions, so the use of the citrate buffered method for beeswax at pH 5-5.5 during extraction provided recoveries above 70% for these analytes.

The frequency of the pesticide residues found in the samples analyzed indicates widespread use in the surrounding areas of honeybee colonies where the beeswax was obtained. Those pesticides are used as insecticides, are considered lipophilic compounds and are retained in wax (Log Kow: 3.81, 5.00, 6.50 for diazinon, chlorpyrifos and permethrin, respectively) (PubChem, 2020). In addition, in beekeeping practices, recycled wax is used in the foundation of the hives, and the old combs are exchanged every two or three years when melted and pure wax is produced. Thus, pesticides that are not degraded during these recycling processes may be present and increase the contamination levels in each reuse process (Bogdanov, 2004). According to the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), among the pesticides, insecticides were the third most marketed in 2017, with approximately 55,000 tons of active ingredients in total (IBAMA, 2018).

Chlorpyrifos is a toxic organophosphate compound that is highly persistent and widely marketed in Brazil. According to the Brazilian regulatory framework, there are 24 formulated products authorized for 13 different cultures as citrus, coffee and soybean crops and its use commonly for foliar application. It is also an anticide in the granular form (AGROFIT, 2020). This pesticide has been reported as a prevalent contaminant in honeybee hives at concentrations of 10-200 ng g⁻¹ (Harriet et al., 2017). In a recent study in Spain, researchers report the occurrence of chlorpyrifos in 50% of beeswax

samples at concentrations ranging from 1 to 88 ng g⁻¹ (García et al., 2017). In Australia, Manning (2018) found concentrations of up to 201 ng g⁻¹ in the foundation beeswax.

Permethrin is another insecticide permitted by the Brazilian regulatory framework, and there are 11 formulated products authorized for 12 different cultures to combat pests that affect for example citrus, coffee and grape crops. (AGROFIT, 2020). In this study, this molecule was present in 79% of the beeswax samples, which suggests its use near the hives or persistence in the beeswax recycling process. Mullin et al. (2010) reported up to 373 ng g⁻¹ of permethrin in wax from the USA and Garcia et al. (2017) reported its occasional occurrence in Spanish honeybee wax comb.

Diazinon, which was only permitted for citrus and apple crops, is a toxic organophosphate with medium persistence and its use is authorized as veterinary product against the horn fly (BRASIL, 2019). This molecule was detected in low concentrations, as reported by Mulin et al. (2010). This pesticide is applied through contamination from the surface of the plants (flowers and leaves), pollen and nectar or water; the pesticide is then transported by the bees and distributed in the hive in products such as wax. The larval honey bees are in direct contact with the residues of the compounds deposited on the walls of the comb cells, so they are most susceptible to exposure to chemical agents such as pesticides.

Permethrin, chlorpyrifos, and diazinon are highly toxic to bees and have contact lethal dose (LD₅₀) values of 0.063, 0.072 and 0.38 µg bee⁻¹, respectively (Sanchez-Bayo & Goka, 2014). The mode of action of organophosphates such as chlorpyrifos and diazinon is by inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which causes hyperexcitability due to the continuous and uncontrolled transmission of nerve impulses causing tremors, convulsions, collapse of the central nervous system and death (V.M.R. Santos et al., 2007). Pyrethroids such as permethrin act as modulators of sodium

channels maintaining the permanent entry of sodium ions (Na^+) causing intoxication resulting in the transmission of repetitive and uncontrolled impulses, hyperexcitability, loss of locomotor, paralysis and death (M.A.T. Santos et al., 2007).

The wax samples with relevant HQ indicates their long-term storage capacity of these pesticides, the compromise of the hive's health, and contamination of other bee products (Perugini et al., 2018). Thus, the beeswax matrix is an important route of exposure to pesticides by bees, and this preliminary study in Brazilian waxes aims to contribute to appropriate protective measures.

Conclusions

The validated QuEChERS GC-MS/MS analytical method proved to be sensitive, reliable and suitable for the intended purpose. The analyzed samples showed the presence of insecticides permitted by the Brazilian legislative framework for use in agriculture and a veterinary product for pest control. Permethrin and chlorpyrifos were present in higher residue levels in beeswax and were the most important contributors to the hazard quotient scores. Thus, beeswax is an apicultural matrix that presents a risk to the bees' health, mainly in the larvae phase. Considering the multiple uses of beeswax (e.g., food, pharmaceutical industry and cosmetics), this study reinforces the recommendation of Calatayud-Vernich et al. (2017) that it is necessary to establish action levels regarding the presence of pesticide residues in beeswax to ensure the quality of beeswax regardless of its expected use.

Acknowledgments

The authors are grateful to the EU Reference Laboratory for Residues of Pesticides – Fruits and Vegetables for providing the facilities for carrying out this study. Ana Paula

F. de Souza thanks the Laboratory of Analytical Chemistry-CPQBA/UNICAMP for the scholarship (FUNCAMP grant number 104663-18) and Felix Reyes acknowledges the National Council for Scientific and Technological Development for the research scholarship (CNPq process number 306141/2017-5).

Disclosure statement

No potential competing interest was reported by the authors.

Funding

This work was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES/PROEX financial code 001).

References

- AGROFIT. (2020). Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários [Phytosanitary Pesticide Systems]. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Benuszak, J., Laurent, M., & Chauzat, M.P. (2017). The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: Room for improvement in research. *Science of Total Environment*, 587-588, 423–438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.062>.
- Bogdanov, S. (2004). Beeswax: quality issues today. *Bee World*, 85(3), 46-50. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2004.11099623>.
- Bogdanov, S. (2009). Beeswax: production, properties composition and control. In: S. Bogdanov (Ed.), *Beeswax book* (1-17). Bee Product Science Publishing.
- Breed, M.D. (2010). Honeybees. In: M. D. Breed & J. Moore. (Eds.), *Encyclopedia of animal behavior* (89-96). Elsevier.

- Castilhos, D., Bergamo, G.C., Gramacho, K.P., & Gonçalves, L.S. (2019). Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 50, 263-272. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., & Picó, Y. (2017). Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Science of the Total Environment*, 605-606, 745-754. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.174>.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., & Picó, Y. (2018). Pesticide residue in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*, 241, 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.062>.
- dos Santos, C.F., Otesbelgue, A., & Blochtein, B. (2018). The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS ONE*, 13(7), e0200286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>.
- EU. 2019. EU Pesticides database. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>.
- García, M.D.G., Duque, S.U., Lozano, A.B., Sosa, A., & Fernández-Alba, A.R. (2017). Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta* 163, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.083>.
- Harriet, J., Campá, J.P., Grajales, M., Lhéritier, C., Pajuelo, A.G., Mendoza-Spina, Y., & Carrasco-Letelier, L. (2017). Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax. *Chemosphere*, 177, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.131>.
- IBAMA. (2017). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. [Manual of pesticide environmental risk assessment for bees]. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/centrais-de-conteudo/2017-07-25-manual-ibama-ara-abelhas-in0217-web-pdf>

- IBAMA. (2018). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatórios de comercialização de agrotóxicos [Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources. Pesticide commercialization reports] <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>.
- Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., & Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2548-2560. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>.
- Manning R. (2018). Chemical residues in beebread, honey, pollen and wax samples collected from bee hives placed on canola crops in Western Australia. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 696–708. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494889>.
- McBean, E.A., & Rovers, F.A. (1984). Alternatives for handling detection limit data in impact assessments. *Groundwater Monitoring & Remediation*, 4, 42-44. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.1984.tb00881.x>
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEgelsdorp, D., & Pettis, J.S. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*, 5(3), e9754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>.
- Niell, S., Cesio, V., Hepperle, J., Doerk, D., Kirsch, L., Kolberg, D., Scherbaum, E., Anastassiades, M., & Heizen, H. (2014). QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticide in beeswax by LC-MS/MS and GC x GC-TOF.

- Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(17), 3675-3683.
<https://doi.org/10.1021/jf405771t>.
- Novais, S.M.A., Nunes, C.A., Santos, N.B., Dámico, A.R., Fernandes, G.W., Quesada, M., Braga, R.F., & Neves, A.C.O. (2016). Effects of a possible pollinator crisis on food crop production in Brazil. *PLoS ONE*, 11(11), e0167292.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167292>.
- Orantes-Bermejo, F.J., Pajuelo, A.G., Megías, M.M., & Fernández-Piñar, C.T. (2010). Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, 49, 243–250. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.3.03>.
- Perugini, M., Tulini, S.M.R., Zezza, D., Fenucci, S., Conte, A., & Amorena, M. (2018). Occurrence of agrochemical residues in beeswax samples collected in Italy during 2013–2015. *Science of the Total Environment*, 625, 470–476.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.321>.
- PubChem. (2020). Open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH).
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Ravoet, J., Reybroeck, W., & de Graaf, D.C. (2015). Pesticides for Apicultural and/or Agricultural Application Found in Belgian Honey Bee Wax Combs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(5), 543-548.
<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1511-y>.
- Sanchez-Bayo F, & Goka K. (2014). Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLoS ONE*, 9(4), e94482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>.
- Sanchez-Bayo F, & Goka K. 2016. Impacts of Pesticides on Honey Bees. In: E. Chambo (Ed.), *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research* (pp. 77-97). IntechOpen.

- SANTE. (2018). Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/11813/2017). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrk_doc_2017-11813.pdf.
- Santos, V.M.R., Donnici, C.L., DaCosta, J.B.N., & Caixeiro, J.M.R. (2007). Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais [Pentavalent organophosphate compounds: history, synthetic methods of preparation and applications such as insecticides and anti-tumor agents]. *Química Nova*, 30(1), 159-170. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100028>.
- Santos, M.A.T., Areas, M.A., Reyes, F.G.R. (2007). Piretróides – uma visão geral [Pyrethroids – an overview]. *Alimentos & Nutrição*, 18(3), 339–349.
- Valdovinos-Flores, C., Alcantar-Rosales, V.M., Gaspar-Ramirez, O., Saldaña-Loza, L.M., & Dorante-Ugalde, J. (2017). Agricultural pesticide residues in honey and wax combs from Southeastern, Central and Northeastern Mexico. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 667-679. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1340798>.

CAPÍTULO 3

Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey

Submetido ao Journal of Food Additives and Contaminants Part B

Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey

Ana Paula Ferreira de Souza^{a,b}, Nadia Regina Rodrigues^b and Felix Guillermo Reyes Reyes^a

^a Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

^b Analytical Chemistry Division, CPQBA, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding Author: Ana Paula Ferreira de Souza

Phone.: + 55 19 21392879

E-mail: anasouza@cpqba.unicamp.br

ORCID

Ana P. F. Souza: <https://orcid.org/0000-0002-7870-4409>

Nadia R. Rodrigues: <https://orcid.org/0000-0002-5524-9781>

Felix G. R. Reyes: <https://orcid.org/0000-0003-0126-3817>

Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey

Ana Paula Ferreira de Souza^{a,b}, Nadia Regina Rodrigues^b and Felix Guillermo Reyes Reyes^a

^a Department of Food Sciences, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^b Division of Analytical Chemistry, CPQBA, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Abstract

Glyphosate (GLY) is the most widely used herbicide in the world and studies have shown that its exposure at sublethal doses has led to reduced sensitivity and decreased associative memory in bees. Thus, a high performance liquid chromatography-fluorescence detector with derivatization reaction was used to determine residues of GLY and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in Brazilian honey. The method attended the validation criteria of the European Union (EU) SANTE 11813/2017 and showed a limit of quantitation of 0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$ for both GLY and AMPA. Residues of these compounds were quantitated in honey samples from five Brazilian States. Six samples showed GLY levels above the EU maximum residue limit (0.05 $\mu\text{g g}^{-1}$) and one sample showed AMPA at 0.10 $\mu\text{g g}^{-1}$. This study indicates the presence of GLY residues in honey from regions that have had high losses of bee colonies and at the same time, high use of GLY in agriculture.

Keywords: pesticide residues, glyphosate, AMPA, honey, food safety, food contamination.

Introduction

Honey is a natural product produced by bees and is consumed *in natura* and used as an ingredient in food and cosmetics due to its therapeutic properties (Abadio Finco et al., 2010; Osés et al., 2016). In Brazil, 43 thousand tons of honey were produced in 2018, with the southern region being the largest producer (38.9%), followed by the northeast (33.6%) and south (21.8%) regions. Brazil is one of the main honey exporters, reaching 8th the ranking of the largest honey and apiculture product exporters in 2017, with a volume of 27 thousand tons of exported honey during the 2010-2017 period (ABEMEL, 2018; IBGE, 2018).

Recently, in countries such as the United States of America (USA) and Brazil, there have been losses of colonies and decreases in pollination (Castilhos et al., 2019; USDA, 2015). In the USA, during the 2017-2018 season, approximately 30% of the colonies were lost, while in the European Union (EU), losses were 32% in some countries (e.g., Portugal, Spain) in the same period (Bruckner et al., 2018; Gray et al., 2019). Castilhos et al. (2019) carried out a survey of data made available in the period 2013-2017 in Brazil, and based on the data provided, they reported that, in this period of five years, the country lost bee colonies and the main cause reported was pesticide exposure. According to Bogdanov (2006), contamination sources can come from the environment or beekeeping practices. Environmental contamination is usually caused by the use of pesticides in places where pollination occurs and, consequently, affects bees and honey and beeswax production (EMBRAPA, 2010; Goulson et al., 2015; USDA, 2015; Willians et al., 2015).

In Brazil, the expansion of soybean cultivation, responsible for deforestation of the Cerrado and the Amazon in Central and North Brazil, respectively and the consequent

widespread use of pesticides continuously can be considered important factors for the loss of hives. Glyphosate (GLY) is one of the most commonly used herbicide and is considered nontoxic, nonselective, systemic and postemergent (Duke & Powels, 2008). However, its use in excess has polluted soils and waters, and its residues have been found in soil, water and food (Gill et al., 2018; Silva et al., 2018).

Neurotoxic and cognitive effects associated with GLY exposure have been reported in species such as zebrafish (Roy et al., 2016) and rats (Gallegos et al., 2016; Martínez et al., 2018). Contrary to the International Agency for Research on Cancer (IARC) classification that treats GLY as a potential carcinogenic to humans (class 2A) (IARC, 2015), the European Food Safety Authority (EFSA) has recognized GLY as safe considering that it is unlikely to pose a carcinogenic risk to humans through dietary intake (EFSA, 2015). The EU has set a maximum residue limit (MRL) of $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ for GLY residues in honey (EC, 2005). However, MRL value for GLY in this food matrix has not been established by Codex Alimentarius (FAO, 2020) or by the regulatory frameworks of the USA (EPA, 2013) or Brazil (AGROFIT, 2020).

The EFSA and EPA established an acute toxicity value (LD_{50}) higher than $100 \mu\text{g bee}^{-1}$ for GLY through direct contact, concluding that GLY is practically nontoxic to honeybees (EFSA, 2015; EPA, 1993). However, Herbert et al. (2014) studied the effects of subchronic GLY exposure to honeybees and reported that exposure at sublethal doses led to reduced sensitivity and decreased associative memory in bees, which means that foraging bees lose their sensory capacity, rendering them unable to return to the hive. In addition, the nutrition status of bees is affected by a reduction in the sources of feeding (Gill et al., 2018).

Honey can be used as a bioindicator to describe the environmental impacts due to pesticide use in agriculture and to provide data to evaluate the risk to human health due

to the consumption of honey contaminated by pesticides (Rissato et al., 2007). Honey contamination by GLY residues and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) has been detected in different countries, such as the USA (Rubio et al., 2014), Switzerland (Zoller et al., 2018), Uruguay (Pareja et al., 2019) and Canada (Thompson et al., 2019).

Honey is a highly complex matrix and GLY and AMPA analysis in environmental and biological matrices is difficult due to their physicochemical characteristics, such as small molecular masses, structural similarity with amino acids and secondary metabolites from plants and high solubility in water (high polarity), thus making it impossible to extract them with nonpolar solvents. Several methods have been reported for the determination of GLY and AMPA residues in different food matrices using chromatographic techniques. Among them, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in cereals and honey (Goscinnny et al., 2012; Zoller et al., 2018), gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) in crops (Alferness & Wiebe, 2001) and liquid chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FLD) in water and agricultural crops (Cowell et al., 1986; Hernández et al., 2000) have been reported. When using the FLD detector, GLY and AMPA are commonly analyzed by a precolumn derivatization reaction with fluorenylmethylchloroformate (9-FMOC-Cl) or postcolumn reaction with o-phthalaldehyde (OPA) (Bernal et al., 2010; Hernandez et al., 2000; Rodrigues & Souza, 2018). Nevertheless, due to the importance of bee colonies for maintaining ecological balance, biodiversity and food production worldwide, the development of sensitive, selective and reliable analytical methods to quantify residues of GLY and its metabolite AMPA in honey is extremely relevant.

Thus, the aim of this study was to obtain representative data on the levels of GLY and AMPA residues in honey from different regions of Brazil. For this purpose, an analytical method by HPLC-FLD with a postcolumn reaction with o-phthalaldehyde was validated and used for the quantitation of GLY and AMPA residues in honey samples.

Material and methods

Chemicals and reagents

GLY and AMPA analytical standards were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA), with purities of 99.8 and 98.7%, respectively. Methanol of HPLC grade was purchased from JT Baker (Massachusetts, USA). All other reagents were of analytical grade. Phosphoric acid (85%) was purchased from Tedia (Ohio, USA). O-phthalaldehyde (OPA) was purchased from Sigma (Missouri, USA), and calcium hypochlorite (CaCl_2O_2), 2-mercaptoethanol (MERC), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), sodium chlorite (NaClO_2), sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl) were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-purified water was obtained from a Milli-Q water system (Massachusetts, USA) with a resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Resin AG1 X8 200-400 mesh and resin Chelex 100-200 mesh were purchased from Bio-Rad (California, USA). The $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ polyvinylidene fluoride (PVDF) filtration membranes were purchased from Millipore (Massachusetts, USA) and used for the filtration of sample extracts.

Standard solutions

GLY and AMPA stock standard solutions ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in ultra-purified water and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Intermediate and standard working solutions were prepared daily by dilution of the stock solutions in ultra-purified water.

Samples

Blank samples of honey were collected from the Cambará apiary, located near the native forest of Cambará do Sul, State of Rio Grande do Sul, Brazil. GLY is not used in agricultural activities in this area. Nevertheless, to ensure that the sample was free of GLY residues, it was analyzed and no peaks were present in the chromatogram at the retention times of GLY and AMPA.

A total of 40 samples of different sizes (from 50 to 500 g) from 23 different sampling points were analyzed. The origin of the samples was as follows: São Paulo State (25), Paraná State (5), Rio Grande do Sul State (5), Minas Gerais State (3), Santa Catarina State (1) and Piauí State (1) (Figure 1). The botanical origin of the samples was polyfloral (29), orange (6) and eucalyptus (5). All honey samples were stored at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to analysis.



Figure 1. Distribution of sampling points in the Brazilian States. (1: Piauí; 2: Minas Gerais; 3: São Paulo; 4: Paraná; 5: Santa Catarina; 6: Rio Grande do Sul).

Sample preparation

Each honey sample (10.0 g, in triplicate) were transferred to a 250 mL polypropylene tube and a 0.1 mol L⁻¹ HCl solution (80 mL) was added. The tube was shaken vigorously by vortexing for 30 s. Next, the pH was adjusted to between 3 and 4 with a 7.5 mol L⁻¹ NaOH solution and then the mixture was centrifuged at 16,000 g for 10 min at 18 °C. The Chelex-100 resin was impregnated with a Fe³⁺ solution and 20 g of this impregnated resin was transferred to a glass column. Then, 60 mL of the supernatant of the honey extract was percolated through the column and washed with 100 mL of a 0.1 mol L⁻¹ HCl solution. Next, GLY and AMPA were eluted with 25 mL of 6 mol L⁻¹ HCl

solution and concentrated HCl (10 mL) was added to the eluate. The solution was homogenized and applied to another glass column containing 15 g of the AG1-X8 resin. After elution with 10 mL of a 6 mol L⁻¹ HCl solution, the clean extract was dried under vacuum at 30 °C and the dry extract was resuspended in 5.0 mL of the HPLC mobile phase. Finally, the resulting extract was filtered through a Millex HV filter unit (0.45 µm pore size, Millipore) directly into an HPLC vial and injected into the HPLC-FLD system.

Instrumentation and conditions

Identification and quantitation of GLY and AMPA were performed using a Shimadzu LC 20A HPLC-FLD system connected to an RF10 AxL fluorescence detector (Tokyo, Japan). Data acquisition was performed by LC Solutions software (Tokyo, Japan). Chromatographic separations were achieved using an Aminex-A9 potassium exchange column (100 mm × 4.6 mm, 5 µm) obtained from Bio-Rad (California, USA). The temperature of the column was maintained at 50 °C. The mobile phase was composed of 0.005 mol L⁻¹ KH₂PO₄ in 4% methanol and the pH was set to 1.9 with 85% phosphoric acid. Isocratic elution mode was applied and the flow rate was 0.6 mL min⁻¹. The injection volume was 50 µL.

Optimization of the postcolumn reaction

The postcolumn reaction was performed using an OPA solution stabilized in MERC and a solution of calcium hypochlorite. After separation in the chromatographic column, fluorescent derivatives were formed and the detection was performed at an excitation wavelength of 330 nm and emission wavelength of 465 nm. A factorial 2³ design with the variables calcium hypochlorite concentration (X1), coil temperature (X2) and flow

rate used in the OPA-MERC solution (X3) was performed. To evaluate the statistical significance of the main effects and interactions, Pareto charts were used. The levels were chosen according to the literature (Colombo & Masini, 2011; Cowell et al., 1986; Jahnke et al., 2014), and all modifications were analyzed by observing the increase in the analyte signal in the chromatograms. Statistical analyses were performed using *Statistica 7.0* software (StatSoft Inc., Oklahoma, USA).

Method Validation and Quality Assurance

In-house validation of the analytical method was conducted based on the European Commission Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/11813/2017) (SANTE, 2018). Thus, method validation was performed through the assessment of the following criteria parameters: selectivity, linearity, limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs), precision and accuracy (as recovery). In addition, robustness was also evaluated using the Youden test according to the European Community Guide 2002/657/EC (EC, 2002).

The selectivity of the method was evaluated by comparing the chromatograms obtained from the blank sample and the sample spiked with GLY and AMPA standard solutions. The chromatograms were evaluated for the presence of the analytical signals at the same retention times observed for the analytes of interest. Linearity was determined from analytical curves obtained by triplicate analysis of GLY and AMPA diluted in solvent (HPLC mobile phase) at the following concentrations: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results were analyzed by the least squares method, and the linearity was expressed as the coefficient of correlation (R^2), the sufficiency of which was adopted as $R^2 \geq 0.99$. The presence of outliers was evaluated by the Grubbs test, and

homoscedasticity was evaluated by the Cochran test. Residual analysis with normal distribution of the analytical curve points was performed obeying the criteria of deviation of the back-calculated concentration from the true concentration ($\pm 20\%$).

Recovery and precision were evaluated by spiking blank samples before the extraction procedure at two levels for GLY and AMPA (0.04 and $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$) in five replicates for each level. The analyses were repeated over 2 days by the same analyst. The recovery data were calculated by comparison between the nominal concentration and experimental concentration after the analysis, and the results were expressed by percentage recovery (%) and the intra-day and inter-day precision were expressed as the coefficient of variation (CV%).

The LODs and LOQs were established by analyzing a blank sample fortified with a standard solution of the analytes (GLY and AMPA). The LOD was determined based on the signal-to-noise (s/n) approach. Thus, the LOD was expressed as the lowest concentration yielding a signal-to-noise ratio of three. The LOQ was taken as the lowest concentration level yielding acceptable precision ($\text{CV} \leq 20\%$) and recovery (range of 70-120%) values.

Robustness was evaluated by the following parameter modifications in the analytical method: (A) increased mobile phase pH; (B) different analytical column brand; (C) decreased mobile phase flow rate; (D) decreased sample pH; (E) decreased sample amount; (F) decreased extraction volume; and (G) increased bath temperature. This was a fractional factorial design and the interactions between the different factors could not be determined (Karageorgou & Samanidou, 2014).

Results and discussion

Optimization of the postcolumn reaction

The postcolumn reaction step involved the oxidation of GLY with calcium hypochlorite to glycine and subsequent reaction with OPA-MERC to produce a fluorescent derivative [1- (2'-hydroxyethylthio) -2-N-alkyl- bindel] (Jahnke et al., 2014).

The results of the main effects and interactions between the factors were evaluated. Statistical differences were verified on factor X3 in the GLY analysis and X1 and X3 in the AMPA analysis. GLY and AMPA presented a decreased response with increasing reaction coil temperature. Still, it was possible to observe that the elevation of the reaction coil temperature could cause bubbles in the system, which will interfere with the derivatization reaction. Calcium hypochlorite at the employed concentration did not interfere with the oxidation of GLY, but for AMPA, an increase in the hypochlorite concentration led to a decreased response. Therefore, to obtain optimal agreement between the variables, the midpoint of each variable was established to conduct the analyses in honey. Thus, an OPA-MERC flow of 0.5 mL min^{-1} , a coil temperature of 38°C and a calcium hypochlorite concentration of 20 mg L^{-1} were implemented.

Validation and Quality Assurance

The method performance with regard to specificity was demonstrated by blank honey sample analysis. No chromatographic signals belonging to interfering compounds within the matrix were observed at the retention times of either GLY or AMPA. Chromatograms of the blank honey sample, spiked sample, analytical standard in solvent and contaminated sample are shown in Figure 2.

The GLY and AMPA retention times were 6.8 min and 10.5 min, respectively. Thus,

chromatographic separation conditions were achieved with a total run time of 15 min.

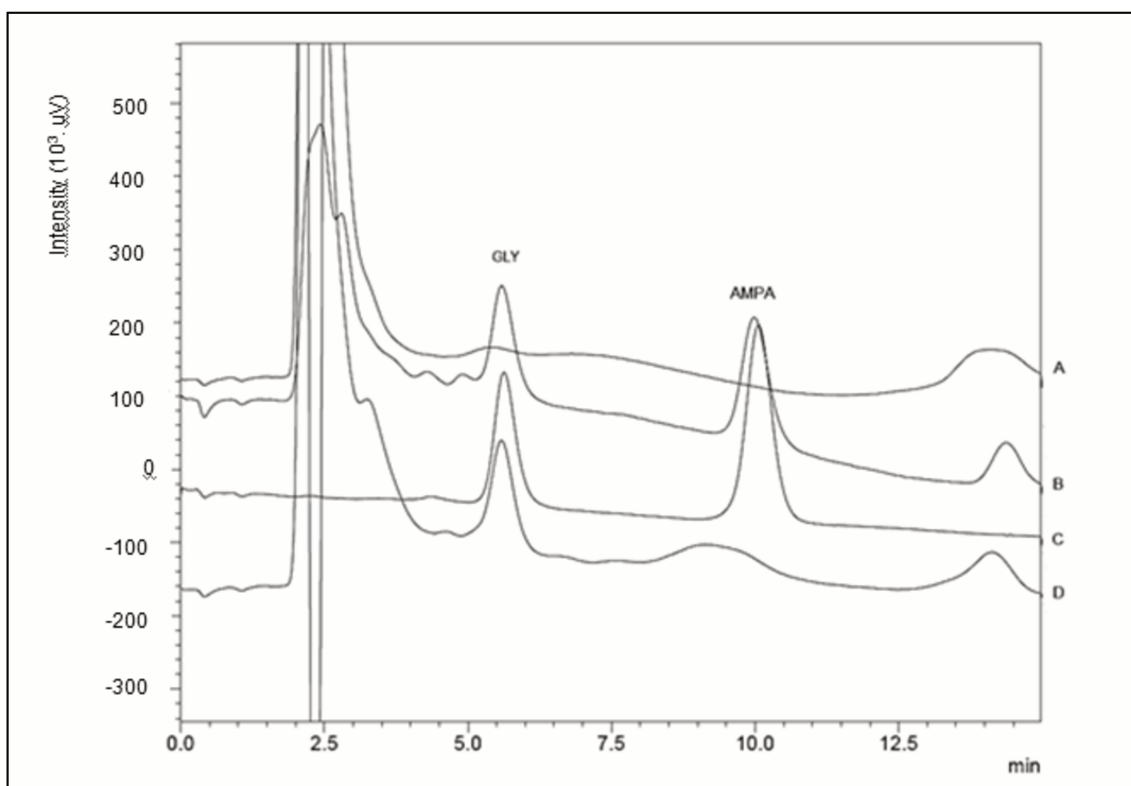


Figure 2. Representative chromatograms of (A) Blank honey sample; (B) Spiked blank sample at $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$; (C) Analytical standard in solvent at concentration of $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$; (D) Analyzed sample.

Quantitation of the GLY and AMPA residues in honey was conducted using external analytical curves that were obtained from three injections of each concentration point at concentrations ranging from 0.05 to $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, with linear regression equations yielding $R \geq 0.99$ for both analytes. ANOVA showed that no deviation of linearity ($p < 0.05$) occurred, the residuals were randomly distributed and the CV was below 20%.

To determine the accuracy and precision of GLY and AMPA quantitation in honey, blank samples ($n = 10$) were fortified at the LOQ level ($0.04 \mu\text{g g}^{-1}$) and at $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$, with five replicates for each concentration. Accuracy (expressed as recoveries, %) and

precision were in accordance with SANTE/11813/2017 guidelines (SANTE, 2018). The validation parameters of the HPLC-FLD analytical method are presented in Table 1.

Table 1. Validation parameters of the analytical method for honey.

Validation parameter	GLY	AMPA
Analytical curve ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.05 – 1.0	0.05 – 1.0
Linearity (R)	0.99	0.99
Precision intra-day (CV%)		
0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$	7	12
0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$	4	6
Precision inter-day (CV%)		
0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$	1	8
0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$	12	2
LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.02	0.02
LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.04	0.04
Accuracy average (%)		
0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$	74	90
0.4 $\mu\text{g g}^{-1}$	79	78

In the robustness evaluation, the averages of each implemented change were compared. The difference in factor A (mobile phase pH) was significantly larger than the differences in the other factors. Therefore, the standard deviation of the eight results was evaluated and for both GLY and AMPA, the test demonstrated that the effect caused by changes in mobile phase pH was significant to the result. Thus, the analytical method is sensitive to changes in mobile phase pH and robust to the other parameters evaluated.

GLY and AMPA residues in honey samples

To quality control, fortification tests at validated levels were conducted in each batch of analyzes. The distribution of GLY residue levels in honey samples according to botanical origin is reported in Table 2. Honey of polyfloral botanical origin showed the

highest number of contaminated samples, as well as the highest GLY residue levels. Fifteen samples had GLY residue levels at or above the method LOQ, which corresponded to 38% of the total samples analyzed. Among these samples, 13 showed GLY residues above the LOQ ($0.04 \mu\text{g g}^{-1}$) reaching up to $0.22 \mu\text{g g}^{-1}$. AMPA was quantitated in only one sample from São Paulo State at $0.10 \mu\text{g g}^{-1}$. Six samples showed GLY residue levels higher than the EU MRL ($0.05 \mu\text{g g}^{-1}$) (EC, 2005). These samples exceeded the maximum value by up to 4.4 times (Table 2).

Table 2. Glyphosate (GLY) residue levels in Brazilian honey according to the botanical origin.

Botanical origin	n	Positive, n (%)	Residue level ($\mu\text{g g}^{-1}$)		$\geq$ EU limit* n (%)
			Mean	Range	
Polyfloral	29	12 (41)	0.07	<LOQ – 0.22	6 (21)
Orange	6	1 (16)	0.04	0.04	-
Eucalyptus	5	2 (40)	0.04	0.04	-
Total	40	15 (38)	0.07	0.04 – 0.22	6 (21)

All samples were analyzed in triplicate, n=number of samples; *samples with GLY residue levels above the European Union default value of $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$.

With the exception of the Minas Gerais and Piauí States samples, those from the other States contained GLY residues. Furthermore, the analyzed samples from Paraná (4 out of 5) and Rio Grande do Sul (2 out of 5) States that contained GLY residues exhibited levels above the MRL established by the EU ($0.05 \mu\text{g g}^{-1}$) (EC, 2005).

It is worth mentioning that Brazil is the country with the largest pesticide consumption in the world and GLY is an herbicide widely used in the cultivation of soybean, coffee, sugarcane, corn, citrus fruits, cotton and other crops (Novais et al., 2016). In addition, the increase in monoculture production and the decrease in native forests in large area contribute to the contamination of honeybees and their products.

According to a report disclosed in 2017 by IBAMA (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources), GLY and its salts were in first place in the ranking of trading, with 173,000 tons (IBAMA, 2018). The southern region of Brazil was the second largest consumer of pesticides, behind only the central-western region. Rio Grande do Sul and Paraná are the second- and third-largest soybean-producing States, respectively, where the herbicide glyphosate is widely used (Embrapa, 2019). In 2017, these States consumed the equivalent of approximately 39,000 tons of herbicides per State (IBAMA, 2018). These facts contributed to the presence of GLY residues in the honey samples.

GLY and AMPA residues have been monitored in different countries. Zoller et al. (2018) and Pareja et al. (2019) did not find AMPA in their analyzed samples. Thompson et al. (2019) found a maximum of $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ AMPA in their samples, but the detection frequency was high (99% in 200 samples). The GLY residue levels in honey from different countries compared with the levels from this study are shown in Table 3.

Table 3. Glyphosate (GLY) residue levels in honey from different countries.

Country	Samples tested	Positive	Maximum level ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Reference
USA	69	41 (59%)	0.16	Rubio et al. (2014)
Uruguay and EU	32	26 (81%)	NR	Pareja et al. (2019)
Canada	200	197 (98.8%)	0.05	Thompson et al. (2019)
Switzerland	16	15 (94%)	0.02	Zoller et al. (2018)
Italy	10	0	-	Chiesa et al. (2019)
Brazil	40	15 (38%)	0.22	This study

NR = not reported

Chronic adverse effects on bee behaviour due to GLY exposure, including the contribution of this herbicide to colony collapse disorder (CCD), have been reported (Herbert et al., 2014). Studies conducted in the EU and Canada have reported GLY residue levels lower than those observed in the USA and in this study. Therefore, the recurrent and relatively high GLY residue levels in honey samples in the USA and Brazil could be associated with losses of bee colonies in these countries. Our study indicates a high presence of GLY residues in Brazilian honey, especially in regions that have had high losses of bee colonies and, at the same time, a high use of GLY in agriculture, particularly in soybean cultivation.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Dr. Patricia Aparecida Campos Braga for her encouragement, assistance and review of this paper and Felix Reyes acknowledges the National Council for Scientific and Technological Development for the research scholarship (CNPq process number 306141/2017-5).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by authors.

Funding

This work was supported by the Laboratory of Analytical Chemistry-CPQBA/UNICAMP (FUNCAMP grant number 104663-18) and the Coordination for the Improvement of Higher-Level Education Personnel (CAPES/PROEX financial code 001).

Supplemental online material

Supplemental online material is available in Mendeley Data at <http://dx.doi.org/10.17632/hnxg4fj3gy.1>

References

- Abadio Finco, D.B., Moura, L.L., & Silva, I.G. (2010). Physical and chemical properties of *Apis mellifera* L honey. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3),706–712. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000300022>.
- ABEMEL. (2018). Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. Setor apícola brasileiro em números. <https://www.brazilletsbee.com.br/INTELIG%C3%84NCIA%20COMERCIAL%20ABEMEL%20-%20JANEIRO2018.pdf>.
- AGROFIT. (2020). Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários [Phytosanitary Pesticide Systems]. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Alferness, P.L., & Wiebe, L.A. (2001). Determination by glyphosate and aminomethylphosphonic acid in crops by capillary gas chromatography with mass-selective detection: collaborative study. *Journal of the AOAC International*, 84(3), 823-846. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.3.823>.
- Bernal, J., Bernal, J.L., Martin, M.T., Nozal, M.J., Anadón, A., Martínez-Larranaga, M.R., & Martínez, M.A. (2010). Development and validation of a liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. *Journal of Chromatography B*, 878(31), 3290–3296. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.013>.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants in bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-8. <https://doi.org/10.1051/apido:2005043>.

- Bruckner, S., Steinhauer, N., Rennich, K., Aurell, S.D., Caron, D.M., Ellis, J.D., Fauvel, A.M., Kulhanek, K., Nelson, K.C., Rangel, J., & Rose, R. (2018). Honey bee colony losses 2017–2018: preliminary results. Bee Informed Partnership. <https://beeinformed.org/wp-content/uploads/2019/11/2017-2018-Abstract.pdf>.
- Castilhos, D., Bergamo, G.C., Gramacho, K.P., & Gonçalves, L.S. (2019). Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 50(3), 263-272. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>.
- Chiesa, L.M., Nobile, M., Panseri, S., & Arioli, F. (2019). Detection of glyphosate and its metabolites in food of animal origin based on ion-chromatography-high resolution mass spectrometry (IC-HRMS). *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36(4), 592-600. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1583380>.
- Colombo, S.M., & Masini, J.C. (2011). Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study a desorption of glyphosate on soil and sediment samples. *Microchemical Journal*, 98(2), 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.02.009>.
- Cowell, J.E., Kunstman, J.L., Nord, P.J., Steinmetz, J.R., & Wilson, G.R. (1986). Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(6), 955-960. <https://doi.org/10.1021/jf00072a006>.
- Duke, S.O., & Powles, S.B. (2008). Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(December 2008), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>.
- EC. (2005). European Community Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council

- Directive 91/414/ EEC, Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R0396-20200518>
- EC. (2002). European Community. Commission Decision 2002/ 657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Commun L. 221:8–36. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>.
- EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11), 4302, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>.
- EMBRAPA. (2019). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja em números (safra 2018/19). <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>.
- EMBRAPA. (2010). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. O desaparecimento das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e as perspectivas do uso de abelhas não melíferas na polinização. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69296/1/Abelha.pdf>.
- EPA. (2013). Environmental Protection Agency. 40 CFR Part 180 [EPA–HQ–OPP–2012–0132; FRL–9384–3]. Glyphosate; Pesticide Tolerances. Federal Register 78(84), 25396 – 25401. May 1, 2013, Rules and Regulations. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2013-05-01/pdf/2013-10316.pdf>.
- EPA. (1993). Environmental Protection Agency. Registration Eligibility Decision (RED) for Glyphosate – EPA. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>.

- FAO. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations International Food Standards. Pesticides Database. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=158.
- Gallegos, C.E., Bartos, M., Bras, C., Gumilar, F., Antonelli, M.C., & Minetti, A. (2016). Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. *NeuroToxicology*, 53, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.11.015>.
- Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16, 401-4026. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>.
- Goscinnny, S., Unterluggauer, H., Aldrian, J., Hanot, V., & Masselter, S. (2012). Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 5, 1177-1185. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9361-7>.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.
- Gray, A., Brodschneider, R., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Cornelissen, B., Costa, C.A., Csáki, T., Dahle, B., Danihlík, J., Dražić, M.M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Graaf, D., Gregorc, A., Johannesen, J., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Patalano, S., Petrov, P., Raudmets, A., Ryzhikov, V.A., Simon-Delso, N., Stevanovic, J., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnaes, F., Williams, A., Zammit-Mangion, M., & Soroker, V. (2019). Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/2018 in 36 countries

- participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal Apicultural Research*, 58(4), 479–85.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661>.
- Herbert, L.T., Vaázquez, D.E., Arenas, A., & Farina, W.M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behavior. *The Journal of Experimental Biology*, 217, 3457-3464. <https://doi.org/10.1242/jeb.109520>.
- Hernandez, F., Hidalgo, C., & Sancho, J. (2000). Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 83(3), 728-34.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/83.3.728>.
- IARC. (2015). International Agency for Research on Cancer Monographs.
<https://www.iarc.fr>
- IBAMA. (2018). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatórios de comercialização de agrotóxicos.
<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>.
- IBGE. (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php>.
- Jahnke, B., Frank, C., Fernández, J.F., & Niemeyer, B. (2014). A sequential injection analysis method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water samples. *American Chemical Science Journal*, 5(2),163-173.
<https://doi.org/10.9734/ACSJ/2015/13089>.
- Karageorgou, E., & Samanidou, V. (2014). Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography A*, 1353, 131–139.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>.

- Martínez, M.A., Ares, I., Rodríguez, J.L., Martínez, M., Martínez-Larranaga, M.R., & Anadón, A. (2018). Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environmental Research*, 161, 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.05>.
- Novais, S.M.A., Nunes, C.A., Santos, N.B., Dámico, A.R., Fernandes, G.W., Quesada, M., Braga, R.F., & Neves, A.C.O. (2016). Effects of a possible pollinator crisis on food crop production in Brazil. *Plos ONE*, 11(11), E0167292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167292>.
- Osés, S.M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M.A., López-Díaz, T.M., & Sancho, M.T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215–1223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.050>.
- Pareja, L., Jesús, F., Heizen, H., Hernando, M.D., Rajski, L., & Fernandez-Alba, A.R. (2019). Evaluation of glyphosate and AMPA in honey by water extraction followed by ion chromatography mass spectrometry. A pilot monitoring study. *Analytical Methods*, 11, 2123-2128. <https://doi.org/10.1039/c9ay00543>.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Almeida, M.V., Gerenutti, M., & Apon, B.M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry* 101, 1719-1726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.034>.
- Rodrigues, N.R., & Souza, A.P.F. (2018). Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35(4), 723-730. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1419286>.

- Roy, N.M., Carneiro, B., & Ochs, J. (2016). Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.003>.
- Rubio, F., Guo, E., & Kamp, L. (2014). Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 5(1), 249-257. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000249>.
- SANTE. (2018). Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/11813/2017). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrk_doc_2017-11813.pdf.
- Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H.G.J., Ritsema, C.J., & Geissen, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of Total Environment*, 621, 1352-1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>.
- Thompson, T.S., Van der Heever, J.P., & Limanowka, R.E. (2019). Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36(3), 434-446. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1577993>
- USDA. (2015). United States Department of Agriculture. Bee **Survey: Lower Winter Losses, Higher Summer Losses, Increased Total Annual Losses.** [<https://www.ars.usda.gov/news-events/news/research-news/2015/bee-survey-lower-winter-losses-higher-summer-losses-increased-total-annual-losses>].

- Williams, G.R., Troxler, A., Retschinig, G., Roth, K., Yanez, O., Shutler, D., Neumann, P., & Gauthier, L. (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honeybee queens. *Scientific Reports*, 5, 14621. <https://doi.org/10.1038/srep14621>.
- Zoller, O., Rhyn, P., Rupp, H., Zarn, J.A., & Geiser, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 11(2), 83-91.

Supplemental online material

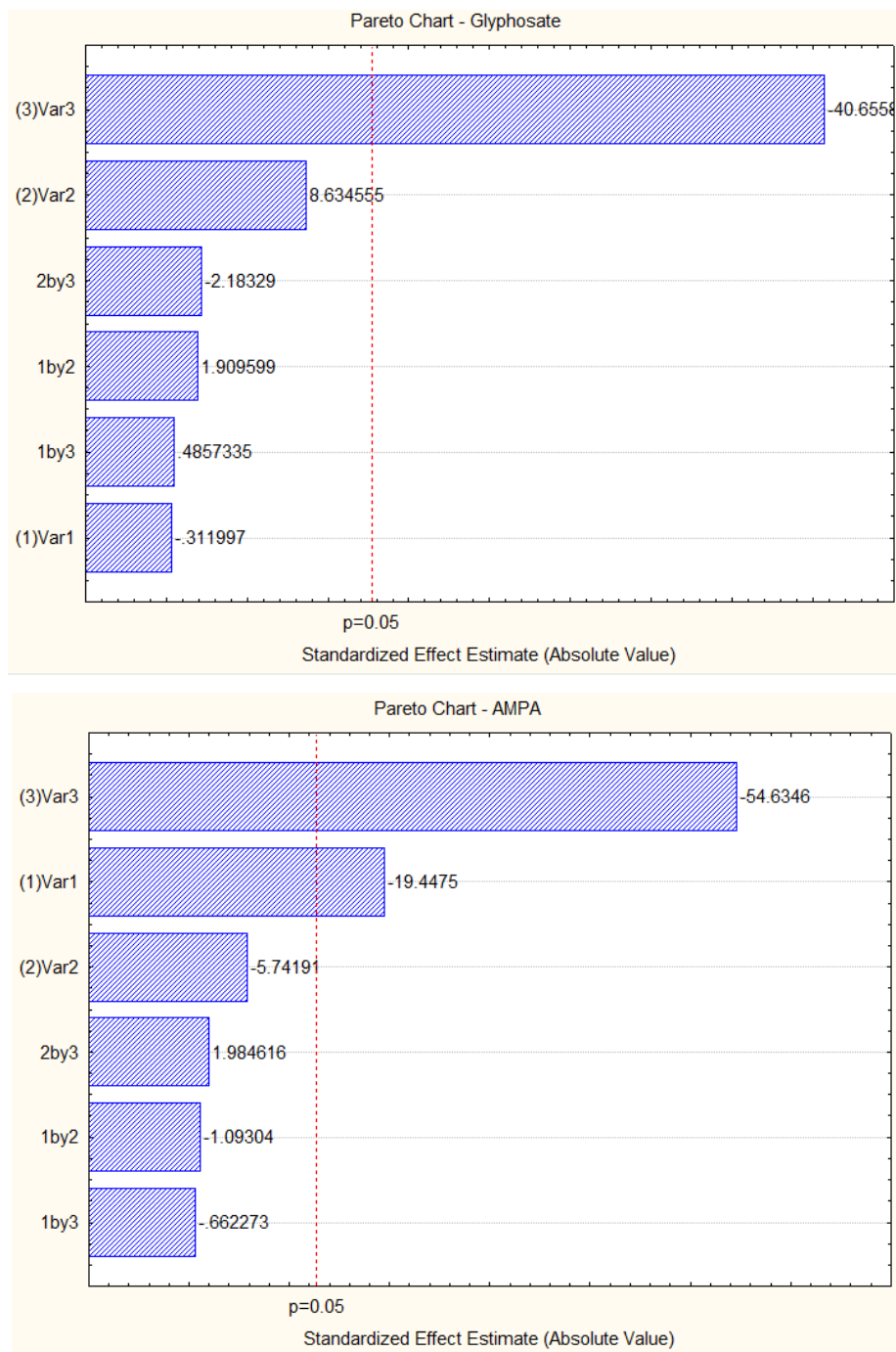
TS1. Levels studied in experimental planning.

Factor	Levels	
X1: calcium hypochlorite concentration (mg L ⁻¹)	15	30
X2: coil temperature (°C)	35	41
X3: flow OPA-MERC (mL min ⁻¹)	0.3	0.7

TS2. Absolute values of the effects and P-value for the 95% confidence interval.

Factors	Effects		P-value	
	GLY	AMPA	GLY	AMPA
X1	-48662	-2437330	0.81	0.03
X2	1346721	-719627	0.07	0.11
X3	-6341034	-6847305	0.02	0.01
X1 X2	297838	-136990	0.31	0.47
X1 X3	75759	-83002	0.71	0.63
X2 X3	-340525	248730	0.27	0.30

Significance $p < 0.05$



FS1. Glyphosate (GLY) and aminomethylphosphonic acid (AMPA) Pareto chart from *Statistica 7.0* ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 4

Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design

Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design

Análisis de residuos de insecticidas en la miel utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem empleando QuEChERS optimizado mediante el diseño de Plackett Burman

Ana Paula Ferreira de Souza^{a,b}, Mateus Henrique Petrarca^a, Patrícia Aparecida de Campos Braga^a, Nadia Regina Rodrigues^b and Felix Guillermo Reyes Reyes^{a*}

^a *Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

^b *Analytical Chemistry Division, CPQBA, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

*Corresponding Author: Felix Guillermo Reyes Reyes

Phone.:+55 19 35212167

E-mail: reyesfgr@unicamp.br

ORCID

Ana P. F. Souza: <https://orcid.org/0000-0002-7870-4409>

Mateus H. Petrarca <https://orcid.org/0000-0002-3709-5731>

Patrícia A. de C. Braga: <https://orcid.org/0000-0002-8932-6888>

Nadia R. Rodrigues: <https://orcid.org/0000-0002-5524-9781>

Felix G. R. Reyes: <https://orcid.org/0000-0003-0126-3817>

Analysis of insecticide residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using QuEChERS optimized by the Plackett Burman design

A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) analytical method using a modified QuEChERS sample preparation for the analysis of insecticide residues in honey was developed and validated. The use of the Plackett Burman design in the sample preparation step proved to be effective in optimizing recovery rates and reducing the matrix effect. For quantitation purposes, extract-matched analytical curves were constructed showing linearity (R^2) higher than 0.99. The precision (RSD%) of the method was lower than 20% and the accuracy was between 74% and 104%. Lower limits of quantitation than the maximum residue limits established by the European Commission and the Brazilian legislative framework were obtained. Insecticide residues were found in 37.3% of 51 real honey samples analyzed, with imidacloprid, clothianidin and dimethoate being the most frequently detected insecticides. The co-occurrence of insecticide residues in samples was frequent. Monitoring insecticide residues in honey is needed to avoid consumer exposure at unacceptable levels.

Keywords: honey; residues analysis; QuEChERS; LC-MS/MS; method validation; Plackett Burman design; pesticide residues; insecticide residues; honey contamination.

Análisis de residuos de insecticidas en la miel utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem empleando QuEChERS optimizado mediante el diseño de Plackett Burman

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) para el análisis de residuos de insecticidas en la miel, utilizando un preparado de muestras QuEChERS modificado. La utilización del diseño de Plackett Burman en la etapa de preparación de la muestra demostró ser eficaz para optimizar las tasas de recuperación y reducir el efecto matriz. Para propósitos de cuantificación se construyeron curvas analíticas preparadas en el extracto, con linealidad (R^2) superior a 0,99. La precisión (RSD%) del método fue inferior al 20% y la exactitud estuvo entre el 74% y el 104%. Se obtuvieron límites de cuantificación inferiores a los límites máximos de residuos establecidos por la Comisión Europea y el marco legislativo brasileño. Se encontraron residuos de insecticidas en el 37,3% de las 51 muestras reales de miel analizadas, siendo imidacloprid, clotianidina y dimetoato los insecticidas detectados con mayor frecuencia. La co-ocurrencia de residuos de insecticidas en las muestras fue frecuente. Es necesario monitorear los residuos de insecticidas en la miel para evitar la exposición del consumidor a niveles inaceptables.

Keywords: miel; análisis de residuos; QuEChERS; LC-MS/MS; validación de método; diseño de Plackett Burman; residuos de pesticidas; residuos de insecticidas; contaminación del miel.

1. Introduction

Honey is complex food and has great diversity in terms of its chemical composition (more than 200 known substances). It consists mainly of carbohydrates (fructose, glucose and sucrose), water and other substances such as proteins, organic acids, vitamins, minerals, pigments and solid particles (Bogdanov, 2006). The use of honey has grown and has been adopted into consumption habits due to its high nutritional value, palatable flavor and medicinal properties. Several authors have reported the presence in the honey of pesticide residues from different classes, mainly neonicotinoid insecticides, organophosphates and pyrethroids (Al Naggar et al., 2015; Codling et al., 2016; Orso et al., 2015).

The presence of insecticide residues induces adverse effects in bees (Jeschke & Nauen, 2005). Therefore, to protect human and environmental health, the European Union has set maximum residue limits (MRLs) for the presence of insecticides in honey (European Data Base, 2019). In Brazil, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) established reference limits for the residues of some pesticides in honey for inspection purposes (MAPA, 2019), and the National Health Surveillance Agency (ANVISA) of the Ministry of Health (ANVISA, 2019) established MRLs for amitraz and coumaphos.

The QuEChERS sample preparation approach has been the most used method for the simultaneous extraction and extract cleanup for the analysis of insecticide residues in honey (Codling et al., 2016; Tette et al., 2016b), and the Plackett Burman design is an alternative for optimization of the sample preparation step with a small number of experiments to assess the effects of the chosen variables under study and establish their levels of influence (Rodrigues & Iemma, 2014).

Methods for quantitation of pesticide residues in honey report the use of gas chromatography with detectors such as electron capture (GC-ECD) (Orso et al., 2014), nitrogen-phosphorus (GC-NPD) (Farajzadeh et al., 2014) and mass spectrometry (GC-MS) (Bargńska et al., 2014). Also, liquid chromatography (LC) with ultraviolet detection (LC-UV) (Jovanov et al., 2015) has been reported. In particular, LC coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been used in multiresidue methods and shows promising performance in the quantitative analysis of several classes of pesticides with different physicochemical characteristics in matrices such as honey (Tette et al., 2016a).

Thus, this work reports a method based on LC-MS/MS with a QuEChERS sample preparation approach optimized through the Placket Burman design given the physical-chemical difference between pesticides and the complexity of the matrix. The method was validated and applied to real samples for the analysis of insecticide (imidacloprid [IMI], clothianidin [CLO], dimethoate [DIM], chlorpyrifos [CPY], cypermethrin [CYP] and permethrin [PER]) residues in honey. Samples from different origins (Brazil, Mexico, Paraguay, and some European countries) were analyzed to evaluate the robustness and reliability of the method.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and analytical standards

All analytical insecticide standards (imidacloprid, clothianidin, chlorpyrifos, permethrin, dimethoate, cypermethrin and the internal standard (IS) imidacloprid *d*-4) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and had purities greater than 99%. Acetonitrile and methanol of HPLC grade were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). All reagents were of analytical grade. Ammonium formate,

formic acid, anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride were provided by Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Primary and secondary amine (PSA), silica-bonded C18 and graphitized carbon black (GCB) sorbents were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). PVDF (polyvinylidene fluoride) syringe filters (0.22 µm) were purchased from Analitica (São Paulo, SP, Brazil). Ultrapure deionized water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Standard solutions

Individual stock standard solutions of all analytes (including the internal standard imidacloprid *d*-4) were prepared in acetonitrile at a concentration of 200 µg mL⁻¹, except for clothianidin stock solution, which was prepared in acetone. From the stock solutions, intermediate solutions were prepared in acetonitrile at two concentrations (10 and 100 µg mL⁻¹). For the preparation of analytical curves [in solvent (acetonitrile) and extract (extract-matched)], proper volumes of the intermediate standard solutions were added to acetonitrile and extracts to prepare 7-point analytical curves of each insecticide standard (equivalent to 10, 25, 50, 75, 100, 150 and 250 µg kg⁻¹ in the blank honey matrix).

2.3. Instrumentation and chromatographic conditions

Analyses were carried out using an Agilent UHPLC 1290 system coupled with a 6400 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Agilent Technologies, CA, USA). Chromatographic separation was achieved on an Agilent Zorbax Eclipse plus RRHD C18 column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 µm) (Agilent Technologies, CA, USA). The mobile phase consisted of (A) 20 mmol L⁻¹ ammonium formate at pH 3.0 and (B) methanol containing 0.1% formic acid. A gradient elution program was used, starting with 15% B

increasing linearly until reaching 95% over 2.2 min, remaining constant for 2.5 min and then returning to 15%, with a total run time of 5.0 min. A post-run time of 3.0 min was necessary to re-equilibrate the column at the initial conditions. The flow rate was 0.6 mL min⁻¹, the column temperature was 45 °C, and the injection volume was 2 µL.

The MS/MS system was equipped with an electrospray ionization (ESI) source and operated in positive ionization mode. The ionization source conditions were optimized employing the *Source Optimizer* tool and were as follows: gas temperature, 300 °C; gas flow, 10 L min⁻¹; nebulizer, 25 psi; sheath gas flow 10 L min⁻¹; sheath gas temperature, 300 °C; capillary, 4.5 kV; and nozzle, 0 kV. These parameters were established by directly injecting individual standard solutions (1 µg mL⁻¹) prepared in acetonitrile into the ESI source. The *Optimizer* tool was also used to provide the most abundant product ions (quantifier and qualifier ions) and the corresponding collision energies (CE) in selected reaction monitoring (SRM) mode (Table 1). The identification criteria were based on the Guidance document SANTE/11813/2017 for LC-MS/MS analysis with acquisition of two transitions ions (qualifier and quantifier ions), retention time (tolerance of ±0.2 min) and ion ratio compliance with a tolerance of ± 30% between the ions (SANTE, 2018).

Table 1. Selected reaction monitoring (SRM) settings for the targeted insecticides using electrospray ionization (ESI) source in positive ionization mode.

Tabla 1. Configuraciones del monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM) para los insecticidas investigados usando una fuente de ionización por electropulverización (ESI) en modo de ionización positiva.

Insecticides	Chemical Class	Molecular Formula	T _R (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Quantifier ion (CE1)	Qualifier ion (CE2)	Fragmentor (V)
Clothianidin	Neonicotinoid	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	1.7	249.0 [M + H] ⁺	250.0>169.0 (9)	250.0>131.9 (13)	64
Imidacloprid	Neonicotinoid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	1.8	255.0 [M + H] ⁺	256.1>209.0 (13)	256.1>175.0 (17)	64
Dimethoate	Organophosphate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	1.9	229.0 [M + H] ⁺	230.0>124.8 (17)	230.0>198.8 (5)	64
Chlorpyrifos	Organophosphate	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	3.9	348.9 [M + H] ⁺	349.9>197.9 (21)	349.9>124.9 (9)	113
Cypermethrin	Pyrethroid	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	4.1	415.1 [M + NH ₄] ⁺	433.1>191.0 (10)	433.1>127.0 (40)	76
Permethrin	Pyrethroid	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	4.3	390.8 [M + NH ₄] ⁺	408.1>183.0 (17)	408.1>355.1 (5)	64

Dwell time = 20 ms; T_R = retention time; CE1 = collision energy 1; CE2 = collision energy 2

2.4. Samples

Blank samples of honey employed for optimization and validation purposes were obtained from Apiário Cambará, Rio Grande do Sul, Brazil.

A total of 51 honey samples were purchased at the retail market or supplied by producers and honey cooperatives in Brazil. Also, samples from other Latin American countries [Paraguay (n = 1) and Mexico (n = 1)] and Europe [France (n = 1), Spain (n = 1), Germany (n = 1), Portugal (n = 1), Greece (n = 1), Cyprus (n = 2) and Italy (n = 3)] were analyzed. All samples were collected between 2017 and 2019, stored at 10 °C and analyzed within their listed shelf life.

2.5. Optimization of the sample preparation step

Sample preparation was based on the QuEChERS approach (Anastassiades et al., 2003), and optimized through the Plackett-Burman (PB) design. Eight sample preparation variables were studied at two levels, low (- 1) and high (+1): the amount of salts used in the extraction step (NaCl and MgSO₄), extraction time, amount of sorbents (C18, GCB, PSA) used in the dispersive solid-phase extraction (d-SPE) and extraction time (Table S1, supplemental material) The effect of each variable on insecticide recoveries was estimated using *Statistica* 7.0 software, adopting a significance level of 10% ($p \leq 0.1$).

2.6. Sample preparation

Sample preparation was carried out using the in-house optimized QuEChERS. Ten grams of a homogenized honey sample was weighed into a 50 mL PTFE centrifuge tube and 10 mL of water was added, followed by vortexing for 5 min. Then, 10 mL of acetonitrile was added, and the samples were vortexed again for 5 min. To induce phase separation and force the insecticides into the acetonitrile phase, 4 g of MgSO₄ and 1.5 g

of NaCl were added into the tubes and the mixture was vortexed for 5 min followed by centrifugation at 3,000 g for 5 min. A 5 mL aliquot of the supernatant was transferred to another PTFE centrifuge tube containing 750 mg of MgSO_4 , 250 mg of PSA and 125 mg of C18 and was vortexed for 2 min and centrifuged at 3,000 g for 5 min. The cleaned extracts were filtered through a Millex HV filter unit (0.22 μm pore size, Millipore) directly into an LC vial and then injected into the UHPLC-MS/MS system.

2.7. *In-house validation*

The performance characteristics of the analytical method were established according to the European Commission (EU) guidance document for pesticide residue analysis in food and feed (SANTE, 2018). The parameters evaluated were selectivity, matrix effect, linearity, precision, accuracy, limits of detection (LODs), limits of quantitation (LOQs) and robustness.

The selectivity was determined based on the LC-MS/MS analysis of analyte-free samples against spiked samples to provide the ability of the method to discriminate the targeted insecticides from interfering matrix compounds in SRM mode. Linearity was assessed through 7-point (10 - 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$) analytical curves prepared in solvent (acetonitrile) and blank honey matrix extract (extract-matched). The matrix effects (ME) were estimated according to Sapozhnikova and Lehotay (2013).

Accuracy and precision (intraday and interday) were assessed through recovery of additions of known amounts of the analytical insecticide standards to the blank honey matrix at two concentration levels, namely, a low level (the LOQ obtained for each target insecticide) and high level (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Accuracy, expressed as recovery (%), was obtained by comparison between the real and measured concentrations from five

individual replicates at each concentration level. Precision, expressed as relative standard deviation (RSD%), was evaluated under repeatability conditions (intraday precision) from five individual replicates at each spiked concentration level analyzed on the same day and under within-laboratory reproducibility (interday precision), which was evaluated from a total of ten individual replicates at each spiked concentration level analyzed on two different days.

The LOD was established as the lowest analyte concentration in the honey extract that resulted in a signal-to-noise ratio of 3:1. However, the LOQ was stated as the lowest analyte concentration in the matrix that could be quantified with acceptable accuracy (between 70 and 120%) and precision (RSD values $\leq 20\%$) (SANTE, 2018).

The robustness was evaluated by applying a 2^3 factorial design, considering small variations inherent in the laboratory routine, such as analytical column batch (# B13211 and # B12238), oven temperature (40 °C and 50 °C) and flow rate of the mobile phase (0.5 mL min⁻¹ and 0.7 mL min⁻¹). All data were analyzed using *Statistica* 7.0 software and adopting a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). The applicability of the method was verified through the analysis of real samples from different origin.

3. Results and Discussion

3.1. Chromatographic conditions

The studied compounds belong to three different chemical classes of insecticides, including neonicotinoids, pyrethroids and organophosphates, with partition coefficients (log P) ranging from 0.57 (IMI) to 6.6 (CYP). Therefore, to achieve suitable simultaneous analyses of the insecticides in terms of selectivity and peak shape, different compositions and proportions of the mobile phase, such as water-methanol,

water-acetonitrile or water-acetonitrile-methanol, as well as an aqueous ammonium formate solution at different concentrations (5, 10 or 20 mmol L⁻¹) and pH (3.0 or 6.0) were tested using a reverse-phase C18 column.

The ionization of pyrethroids is favored with methanol, and this insecticide class ionized more efficiently with ammonium formate at a concentration of 20 mmol L⁻¹, increasing ammonium adduct ion formation $[M + NH_4]^+$. A pH of 3.0 provided enhanced ionization of the neonicotinoids and the acidification of methanol with 0.1% formic acid provided analytical signals with optimal shape with ESI in positive ionization mode, as indicated by Lehotay and Mastovska (2005).

Neonicotinoids are extremely polar compounds (log P 0.57 and 0.7 for IMI and CLO, respectively) and show poor interaction with the stationary phase used; thus, the elution gradient was optimized to improve the separation efficiency and avoid the elution of these compounds in the column dead volume. In addition, the permethrin isomers could be visualized in the chromatogram, and both were considered for quantitation purposes. Thus, the chosen mobile phase was a 20 mmol L⁻¹ aqueous ammonium formate solution at pH 3.0 (A) and methanol with 0.1% formic acid (B) with gradient elution. Figure 1 shown SRM chromatograms of a standard solution in the honey extract at a level of 100 µg kg⁻¹.

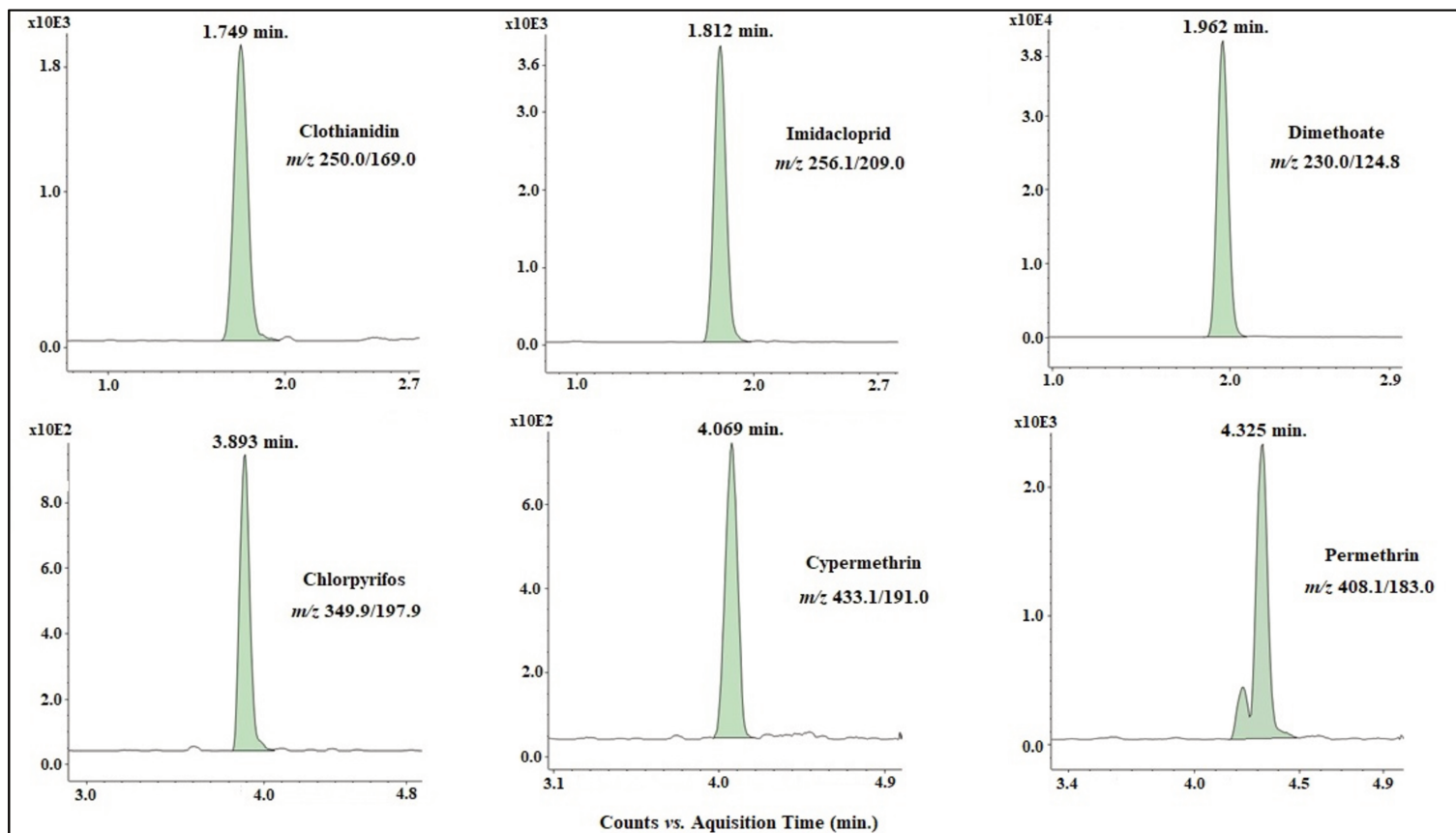


Figure 1. Representative of selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of spiked honey extracts with clothianidin, imidacloprid, dimethoate, chlorpyrifos, cypermethrin and permethrin ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). **Figura 1.** Cromatogramas del monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM) característicos de extractos de miel enriquecidos con clotianidina, imidacloprid, dimetoato, clorpirifos, cipermetrina y permetrina ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

3.2. Optimization of the sample preparation step

Honey is a complex matrix that requires a sample preparation with efficient cleanup step to eliminate possible LC-MS/MS interferences (Bogdanov, 2006; Rissato et al., 2007). The QuEChERS procedure has been widely used for honey analyses and several modifications to the original method have been reported due to the physicochemical characteristics of the compounds investigated (Al Nagggar et al., 2015; Codling et al., 2016; Tette el al., 2016b). In the present study, the target insecticides cover a wide range of polarities with log P values between 0.57 (IMI) and 6.6 (CYP). Thus, a Plackett-Burman screening design was used to evaluate sample preparation variables that could affect the insecticide extraction as well as to minimize the amount of chemicals employed in the sample preparation step.

The experimental design was conducted in according to Rodrigues and Iemma (2014) and resulted in recoveries from 36% to 138% (Table S1, supplemental material). The effect (%) was calculated from the recoveries obtained (Table 2).

It was verified that the amount of NaCl and MgSO₄ salts used to induce phase separation as well as the amount of PSA and C18 sorbents used in the cleanup step significantly influenced ($p \leq 0.1$) the insecticide recoveries.

Table 2. Main effects of evaluated parameters on the recovery (%) of insecticides estimated according the Plackett-Burman design. **Tabla 2.** Principales efectos de los parámetros evaluados sobre la recuperación (%) de insecticidas, estimados según el diseño de Plackett-Burman.

		CYP	PER	CPY	CLO	DIM	IMI
Extraction step							
NaCl (g)	Effect (%)	44.33	13	-0.33	2.33	1.33	-0.83
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	3.72	8.98	-0.20	1.07	0.85	-0.52
	p-value	0.01	0.0001	0.85	0.33	0.43	0.62
MgSO ₄ (g)	Effect (%)	12.67	0.33	-4.33	-18.33	-6.67	-9.50
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	1.06	0.23	-2.62	-8.37	-4.23	-5.92
	p-value	0.33	0.83	0.04	0.0002	0.006	0.001
Vortex (min)	Effect (%)	-14	-2.33	0	2.33	-1.33	-1.83
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	-1.18	-1.61	0	1.07	-0.85	-1.14
	p-value	0.28	0.16	1	0.33	0.43	0.30
d-SPE cleanup							
MgSO ₄ (mg)	Effect (%)	40.33	7.33	0.33	6	1.67	2.17
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	3.39	5.06	0.2	2.74	1.06	1.35
	p-value	0.01	0.002	0.85	0.03	0.33	0.23
PSA (mg)	Effect (%)	-11	-1.66	0	5.67	5	6.50
	Standard error	11.90	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	-0.93	-1.15	0	2.59	3.17	4.05
	p-value	0.39	0.29	1	0.04	0.02	0.007
C18 (mg)	Effect (%)	-12.67	-6.33	-2.33	1.33	1.67	1.17
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	-1.06	-4.37	-1.41	0.61	1.06	0.73
	p-value	0.33	0.005	0.21	0.57	0.33	0.50
CGB (mg)	Effect (%)	-12.67	-5.33	0.33	7.33	0.33	0.5
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	-1.06	-3.68	0.20	3.35	0.21	0.31
	p-value	0.33	0.01	0.85	0.02	0.84	0.77
Vortex (min)	Effect (%)	-11.33	3	3	-1.33	1	1.50
	Standard error	11.91	1.45	1.66	2.19	1.58	1.61
	t(6)	-0.95	2.07	1.81	-0.61	0.63	0.93
	p-value	0.38	0.08	0.12	0.57	0.55	0.39

CYP = Cypermethrin; PER = Permethrin; CPY = Chlorpyrifos; CLO = Clothianidin; DIM = Dimethoate; IMI = Imidacloprid.

The variation in the amount of MgSO_4 from 2 g to 6 g resulted in a significantly negative effect ($p \leq 0.1$) on the recovery of neonicotinoid (imidacloprid and clothianidin) and organophosphate (dimethoate and chlorpyrifos) insecticides, whereas an increase in the amount of NaCl from 0.5 to 1.5 g resulted in a significantly positive effect ($p \leq 0.1$) on the recovery of pyrethroids (permethrin and cypermethrin). Therefore, 4 g of MgSO_4 (central point condition) and a high amount of NaCl (1.5 g) were chosen as optimal conditions for the extraction step. In addition, variations in the time of vortex agitation from 5 to 25 min resulted in no significant effects ($p > 0.1$) on the recoveries; thus, the time was maintained at 5 min.

Regarding the d-SPE step, variations in the amount of C18 (from 125 to 375 mg), GCB (from 0 to 75 mg) and PSA (from 125 to 375 mg) sorbents were evaluated. C18 has been used in d-SPE to remove lipids, and GCB is extremely efficient in removing pigments such as chlorophyll and carotenoids, but it has a significant effect on the recovery of some structurally planar pesticides. PSA is an anion-exchange sorbent used mainly to remove polar coextracted matrix components, including sugars, organic acids and some pigments, such as anthocyanidins (Lehotay & Mastovska, 2005). The increase in the amounts of C18 and GCB resulted in a significantly negative effect ($p \leq 0.1$) on permethrin recovery; thus, the minimal amount of both sorbents was adopted for the cleanup step.

An increase in the amount of PSA resulted in a significantly positive effect ($p \leq 0.1$) on the recoveries of imidacloprid, clothianidin and dimethoate, all compounds with relatively low log P values (0.57, 0.7 and 0.78, respectively). On the other hand, negative effects were observed for compounds with relatively high log P values, such as

permethrin (6.5) and cypermethrin (6.6). Thus, the amount of PSA was fixed at the central point (250 mg).

In addition to cleanup sorbents, the amount of MgSO_4 used in the d-SPE step and the time of vortex agitation were also evaluated. Variation in the amount of MgSO_4 from 250 to 750 mg resulted in positive effects on the recovery of all compounds; thus, the maximum amount studied was adopted on the d-SPE step. Since the increment in the agitation time from 2 to 8 min produced negative effects on the recovery of cypermethrin and clothianidin, this variable was fixed at the minimum level studied.

Therefore, based on the Plackett-Burman screening design, the optimal sample preparation conditions were 4 g of MgSO_4 and 1.5 g of NaCl in the liquid-liquid partitioning step, under 5 min of vortex agitation, followed by 750 mg of MgSO_4 , 250 mg of PSA and 125 mg of C18 in the d-SPE step and under 2 min of vortex agitation. Under these conditions, clean honey extracts were obtained, and the insecticide recoveries ranged from 77 to 88%, which met the criteria established by SANTE 11813/2017 (SANTE, 2018) (Figure S1, supplemental material).

3.3. LC–MS/MS method validation

No analytical signals were observed at the insecticide retention times when comparing the SRM chromatograms obtained from the blank matrix with those obtained from the spiked honey sample, demonstrating the selectivity of the method (Figure S2, supplemental material).

Linearity was evaluated and the presence of outliers was checked by the Grubbs test, and the homoscedasticity of the regression residuals was evaluated by the Cochran test. A weighted ($1/x$) linear least-squares regression (WLS) was used and the

coefficients of determination (R^2) obtained were ≥ 0.99 for all analytes. The distribution of residues at each point was less than $\pm 20\%$ in the range studied (Table 3).

Matrix effects (%) were estimated with a signal increment observed for all analytes except for dimethoate, which showed signal suppression. The results demonstrated the effectiveness of the cleanup step on the removal of coextracted matrix compounds that are associated with the suppression or enhancement of analytical signals (Sapozhnikova and Lehotay, 2013).

An LOQ of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ was obtained for all target insecticides, except for cypermethrin which had an LOQ of $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. These LOQ values were suitable for the monitoring of the targeted insecticides at the MRL values established by the EU (European Data Base, 2019) and the reference limits established by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA, 2019) for pesticide residues in honey.

For all insecticides, the average recovery values ranged from 84 to 104% at the low concentration level and were between 74 and 85% at the high concentration level (Table 3).

For intraday precision, the highest RSD value (16%) was observed for cypermethrin at the LOQ level ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), whereas within interday precision, an RSD value of 15% was achieved for chlorpyrifos and clothianidin at the LOQ level ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Table 3).

Table 3. Maximum residue limits (MRL) and validation data of the analytical method for the determination of insecticide residues in honey.

Tabla 3. Valores de límites máximos de residuo (LMR) y datos de validación del método analítico para la determinación de residuos de insecticidas en la miel.

Insecticides	Brazil MRL (µg kg ⁻¹)	EU MRL (µg kg ⁻¹)	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)	Linearity (R ²)		ME (%)	Recoveries Mean		Precision			
								Low	High	Intra-day (n=5) RSD (%)		Inter-day (n=10) RSD (%)	
					Solvent	Extract				Low	High	Low	High
Cypermethrin	50	50	25.0	50.0	0.9955	0.9906	3.2	85	82	16	8	13	9
Permethrin	880	N.A.	2.0	10.0	0.9987	0.9935	0.84	84	74	11	4	12	5
Chlorpyrifos	50	50	5.0	10.0	0.9918	0.9950	9.3	91	74	14	2	15	5
Clothianidin	N.A.	50	2.0	10.0	0.9968	0.9950	-0.17	94	79	12	6	15	6
Dimethoate	10	N.A.	2.0	10.0	0.9979	0.9984	-4.9	104	75	4	3	4	2
Imidacloprid	50	50	2.0	10.0	0.9980	0.9987	8.9	100	83	4	2	3	5

N.A. = not available; ME = matrix effect; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantitation; Low= LOQ, 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for cypermethrin and 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the others; High = 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for all insecticides.

The robustness of the proposed method was demonstrated based on the same analytical variations inherent to the pre-established conditions when analyzing honey samples from different origin. No significant influences ($p \leq 0.05$) on insecticide peak area was observed (Table S2 and Figure S3, supplemental material).

3.4. Occurrence of insecticide residues in honey

Fifty-one honey samples were analyzed for the presence of the target insecticides using the validated LC-MS/MS method, including samples from European and Latin American countries. Overall, 62.7% of the samples analyzed did not show detectable residues. However, residues of the targeted insecticide were detected in 35.3% of the samples at levels lower than the LOQ. The MRLs established by the EU (European Data Base, 2019), as well as the reference limits established by MAPA (2019) were exceeded in 2% of the samples. Regarding the samples from Brazil ($n = 39$), residues were found in 15 samples (38.5%), all with levels below the LOQ. Among the samples from Europe ($n = 10$) and other Latin American countries ($n = 2$), three samples (25%) presented residues below the LOQ, whereas one sample (8.3%) exceeded the MRL (Figure 2). This noncompliant honey sample was from Spain and contained cypermethrin residues at $102 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figure 3).

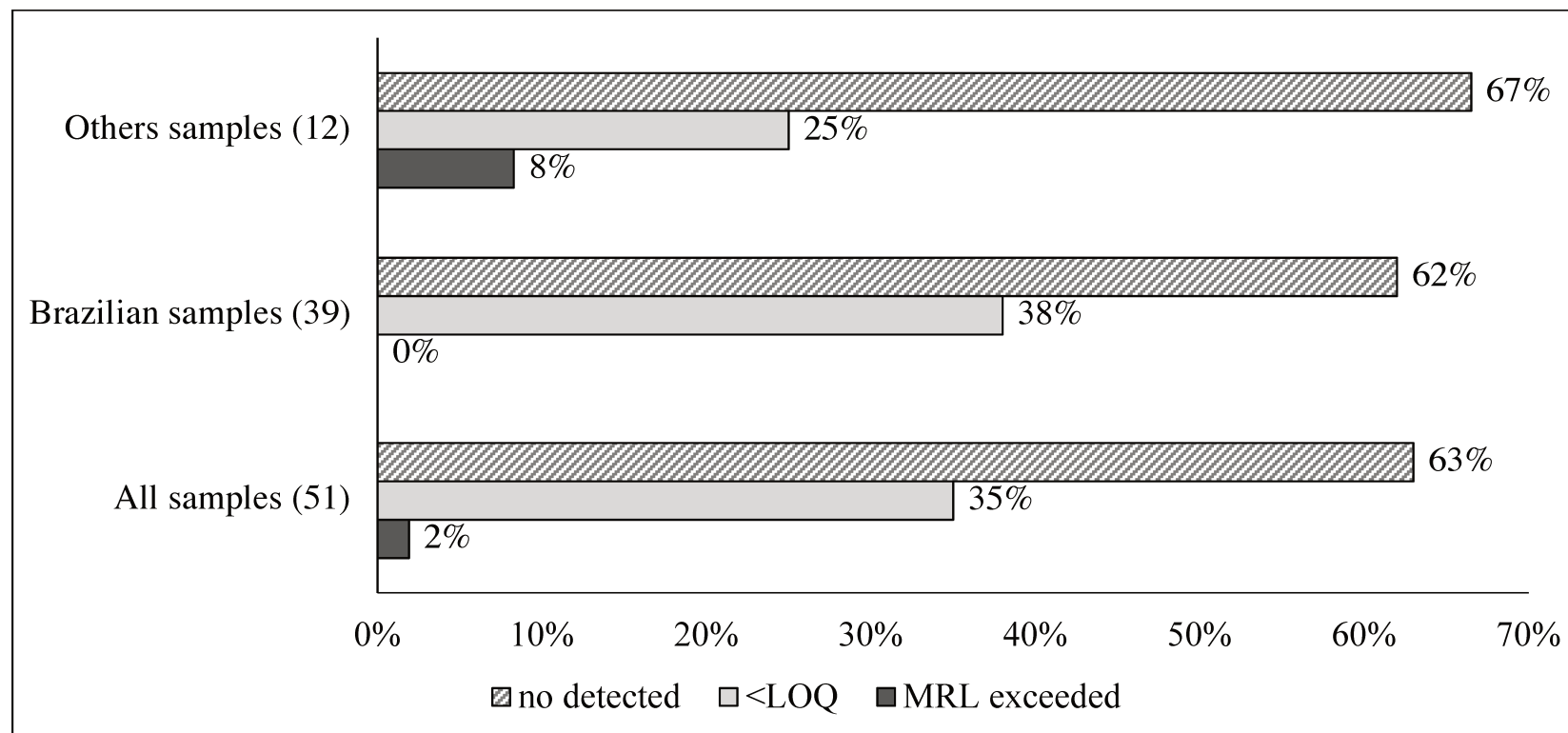


Figure 2. Distribution of insecticide residues in real honey samples acquired at the retail market.

Figura 2. Distribución de residuos de insecticidas en muestras reales de miel adquiridas en el mercado al por menor.

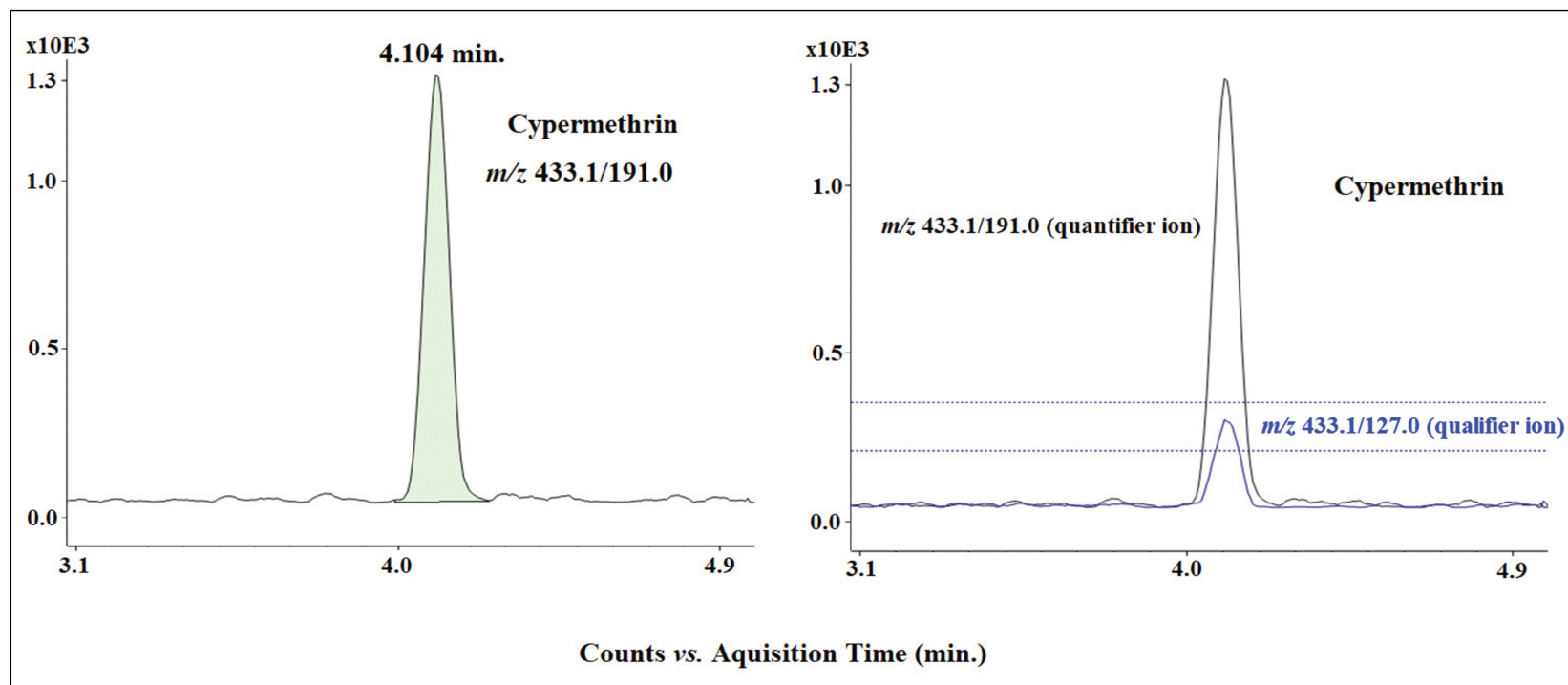


Figure 3. Selected reaction monitoring (SRM) chromatogram obtained from a honey sample from Spain contaminated with cypermethrin at 102 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Figura 3. Cromatograma del monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM) obtenido de una muestra de miel de España contaminada con cipermetrina a 102 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

In all samples the most common insecticides detected (in at least 5 samples) were imidacloprid, clothianidin, dimethoate and cypermethrin. The frequency of detection for imidacloprid (27.5%, 13 Brazilian and 1 Spanish sample), clothianidin (11.8%, 4 Brazilian, 1 Italian and 1 Spanish samples), dimethoate (31.4%, 14 Brazilian, 1 French and 1 Spanish sample) and cypermethrin (9.8%, 2 Brazilian, 1 Italian, 1 Greek and 1 Spanish sample) were relatively high. Since 2013, imidacloprid and clothianidin have use restrictions in the European Union to protect pollinating insects (EFSA, 2018).

In monitoring studies conducted in Brazil, the presence of chlorpyrifos and dimethoate at levels below the MRL established by the EU and the reference limits adopted in Brazil (MAPA, 2019) was reported in honey samples from the State of Rio Grande do Sul (Orso et al., 2015). Tomasini et al (2012) did not find residues of imidacloprid nor thiametoxan in samples from the south of Brazil.

Regarding other monitoring studies, neonicotinoid insecticides such as imidacloprid, thiametoxan, thiacloprid and some metabolites have been reported in honey from Canada (Codling et al., 2016), Serbia (Jovanov et al., 2015), Spain (Sánchez-Hernández et al., 2016) and Poland (Gawel et al., 2019).

In the most recent annual report, the European Food Safety Authority (EFSA) reported the results of the EU-coordinated control program on food analyzed in 2018. Among the honey and other bee products analyzed (762 samples), 78.9% of samples did not show pesticide residues, whereas 1.2% of samples contained residues above the MRL. The substances that exceeded the MRL value established by the EU were the insecticide acetamiprid, the herbicide glyphosate, the fungicide boscalid and the antibiotic dimoxystrobin (EFSA, 2020).

Considering the results found in this study, it is suggested to improve the management on the use of pesticides in general, mainly insecticides, in agricultural

practice to avoid inappropriate residue levels in honey, protecting the human and environmental health and maintaining trade for this food commodity.

4. Conclusion

The LC-MS/MS analytical method developed and validated according to European Commission SANTE/11813/2017 was reliable and appropriate for the intended purpose of quantitation of insecticide residues in honey. The optimization of the sample preparation step (extraction and cleanup) using an experimental design (Plackett Burman approach) enable higher analytes recovery and reduces the matrix effect, allowing obtaining lower LOQ values. The analysis of real honey samples from different origins proved the method's robustness and applicability. Imidacloprid, clothianidin, dimethoate and cypermethrin were the insecticide more detected in the samples, being that in one sample cypermethrin MRL was exceed. These indicate there is a recurrent environmental contamination. Thus, it is recommended that regulatory agencies conduct surveillance programs to assess pesticide residues in honey to avoid unnecessary consumer exposure to these toxic compounds.

Acknowledgments

One author acknowledges the National Council for Scientific and Technological Development for the research scholarship (CNPq process number 306141/2017-5).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation-Agilent Technologies (Grant number 2013/50452-5) and the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/PROEX financial code 001).

Declaration

All of the listed authors have participated in the preparation of this document.

References

- Al Nagggar, Y., Codling, G., Vogt, A., Naiem, E., Mona, M., Seif, A., & Giesy, J.P. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.039>.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., & Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants in bee products. *Apidologie*, 37, 1-8. <https://doi.org/10.1051/apido:2005043>.
- Codling, G., Al Nagggar, Y., Giesy, J.P., & Robertson, A.J. (2016). Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere*, 144, 2321-2328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.135>.

- EFSA. (2020). European Food Safety Authority. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 18(4), 6057, 103 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6057>.
- EFSA. (2018). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal*, 16(2), 5178, 113 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5178>.
- European Data Base. (2019). Maximum Limits Residue Levels. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en.
- Farajzadeh, M.A., Mogaddan, M.R.A., & Ghorbanpour, H. (2014). Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1347, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.067>.
- Gaweł, M., Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M., Burek, O., & Posyniak, A. (2019). Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 282, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>.
- Jeschke, P., & Nauen, R. (2005). Neonicotinoid Insecticides. In: L.I. Gilbert, K. Iatrou, & S.S. Gill (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 53-105). Elsevier.
- Jovanov, P., Guzsvány, V., Lazic, S., Franko, M., Sakac, M., Saric, L., & Kos, J. (2015). Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in

- honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 106–113.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.021>.
- Lehotay, S.J. & Mastovska, K. (2005). Determination of pesticide residues. In: S. Otle (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (pp. 329-359). CRC press.
- MAPA. (2019). Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction 5 of April 23, 2019. National Plan for the Control of Residues and Contaminants in Animal Products - PNCRC of 2019.
<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/PNCRC2019SamplingPlan.pdf/view>.
- Orso, D., Floriano, L., Ribeiro, L.C., Bandeira, N.M., Prestes, O.D., & Zanella, R. (2015). Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9, 1638-1653.
<https://doi.org/10.1007/s12161-015-0339-8>.
- Orso D, Martins ML, Donato FF, Rizzetti TM, Kemmerich, M., Adaime, M.B., & Zanella, R. (2014). Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(8), 1355-1364.
<https://doi.org/10.1007/s12161-015-0339-8>.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Almeida, M.V., Gerenutti, M., & Apon, M.B. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101, 1719-1726. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.034>.

- Rodrigues, M.L., & Iemma, A.F. (2014). *Experimental Design and Process Optimization*. CRC Press.
- SANTE. (2018). Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/11813/2017). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.
- Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S.J. (2013). Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analitcal Chimica Acta*, 758, 80-92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.034>.
- Tette, P.A.S., Guidi, L., Glória, M.B.A., & Fernandes, C. (2016a). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124-141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.045>.
- Tette, P.A., Oliveira, F.A., Pereira, E.N., Silva, G., Glória, M.B., & Fernandes, C. (2016b). Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 211, 130-139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.036>.
- Tomasini, D. S., Maicon, R.F., Caldas, S.S., Buffon, J.G., Duarte, F.A., Primel, E.G. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5- hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99, 380–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.068>.

Supplemental material

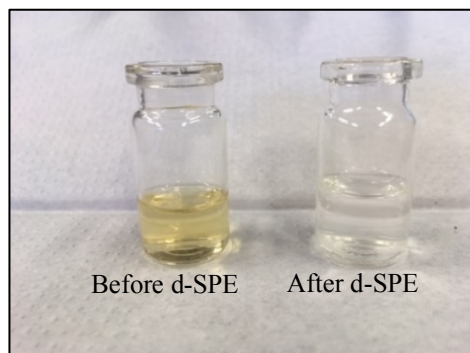


Figure S1. Honey extracts before and after the d-SPE step using the modified QuEChERS sample preparation approach demonstrating the extract cleaning.

Figura S1. Extractos de miel antes y después de la etapa d-SPE utilizando el método de preparación de muestras QuEChERS modificado que demuestra la limpieza del extracto.

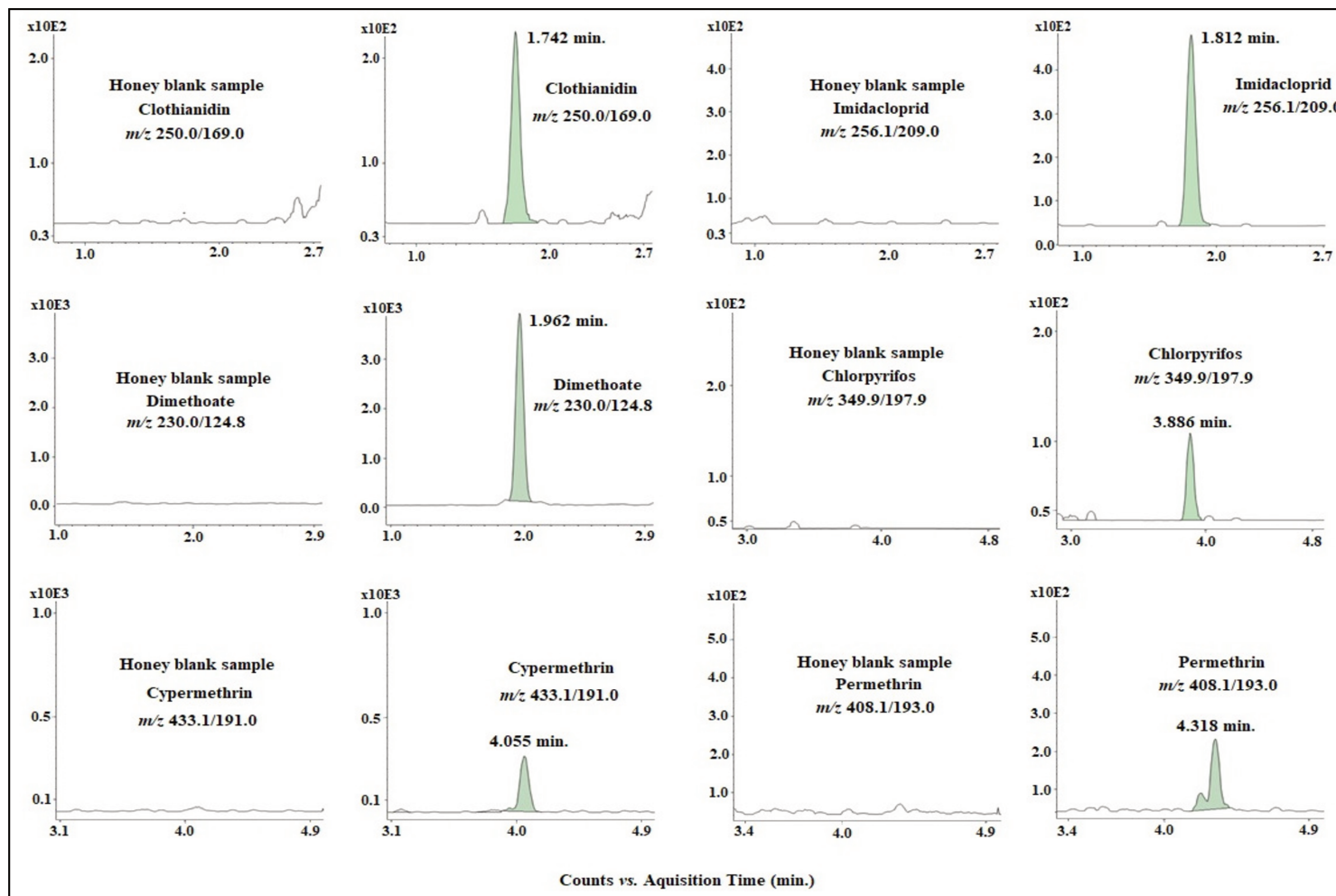
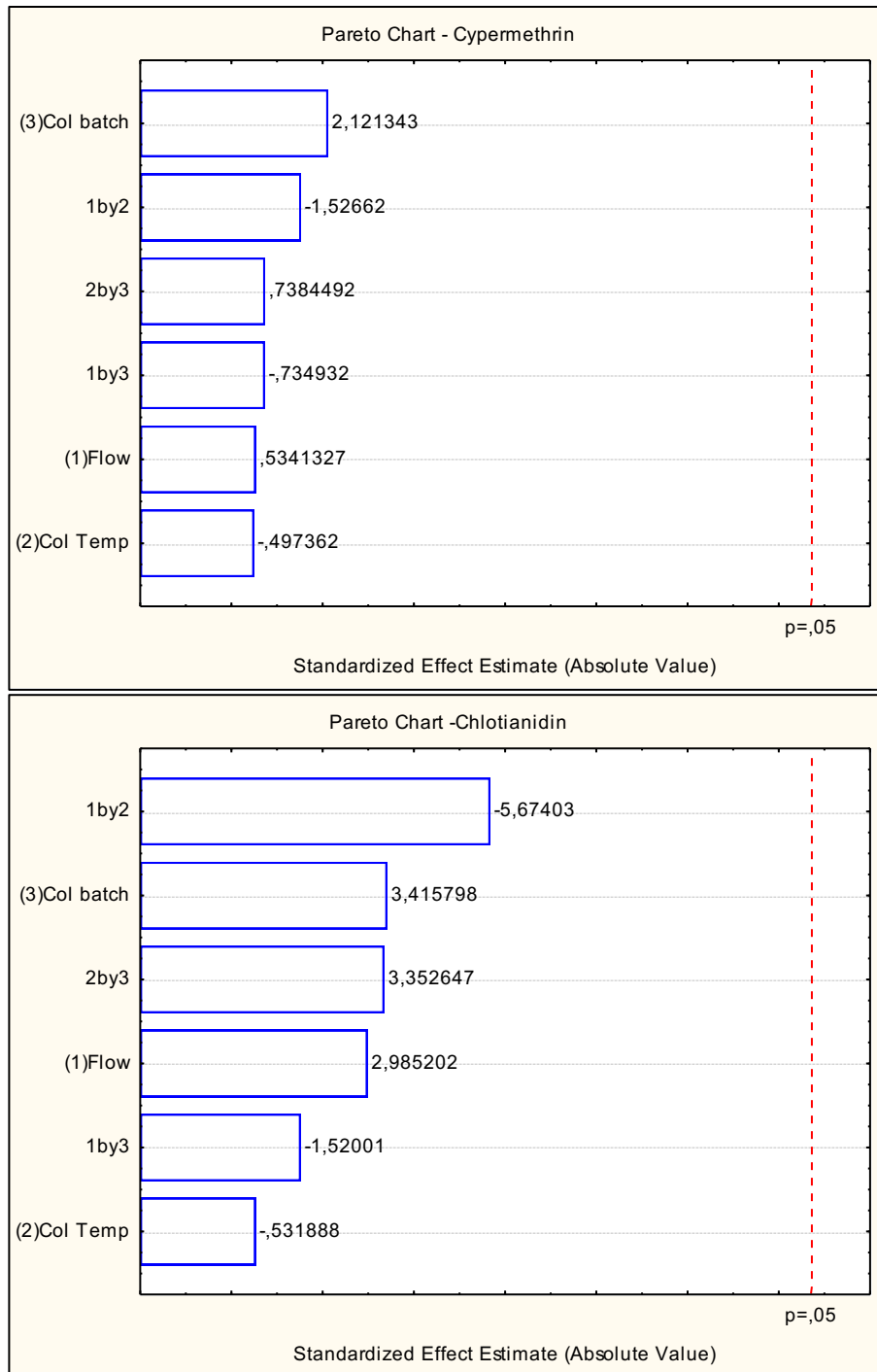
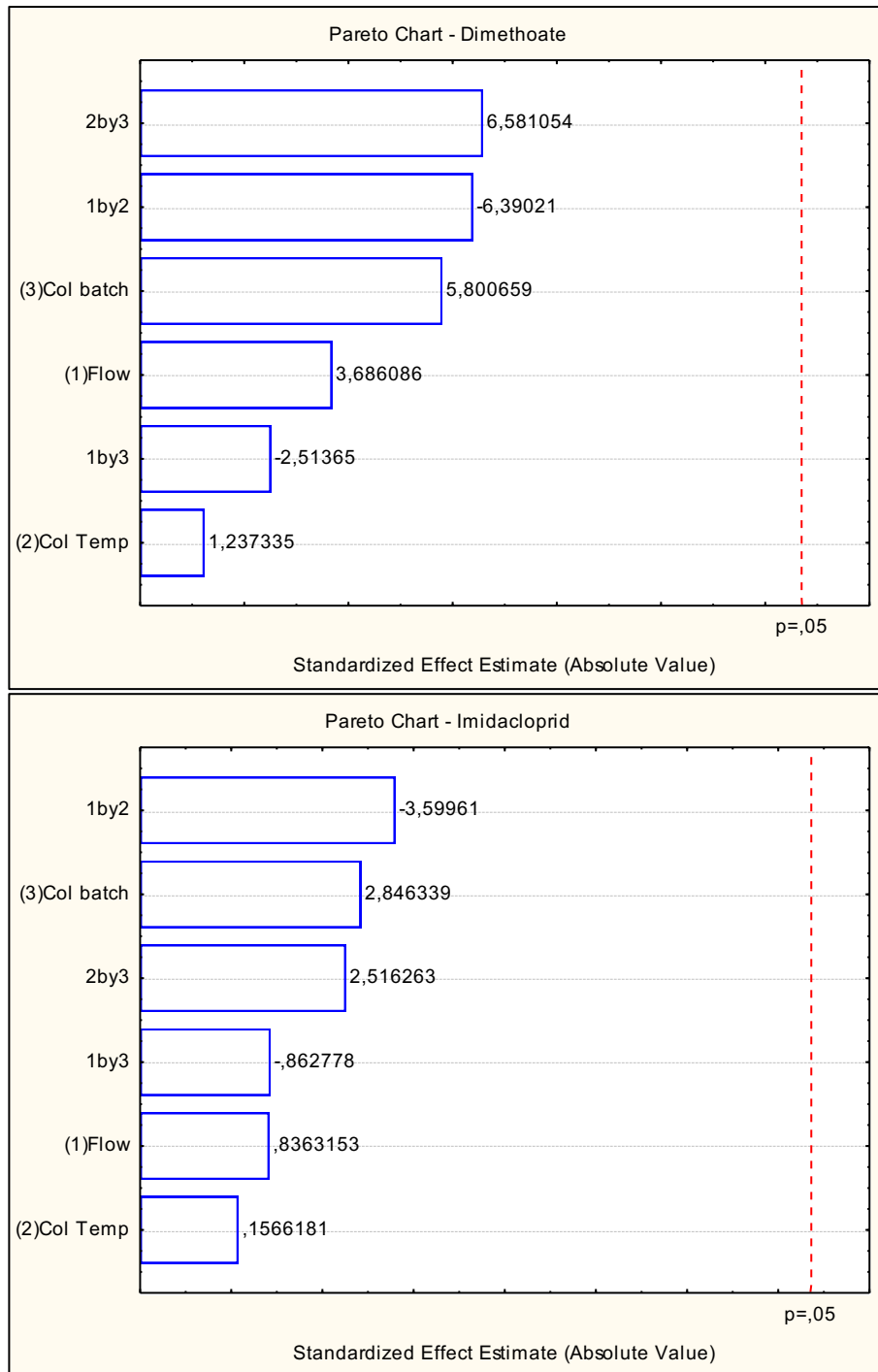


Figure S2. Extracted chromatograms for blank honey and blank honey spiked with clothianidin, imidacloprid, dimethoate, chlorpyrifos, cypermethrin, and permethrin at the limit of quantitation (LOQ) ($10\text{--}50\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) of each analyte.

Figura S2. Cromatogramas extraídos para miel blanco y miel blanco enriquecida con clotianidina, imidacloprid, dimetoato, clorpirifos, cipermetrina y permetrina en el límite de cuantificación (LOQ) ($10\text{--}50\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) de cada analito.



(cont.)



(cont.)

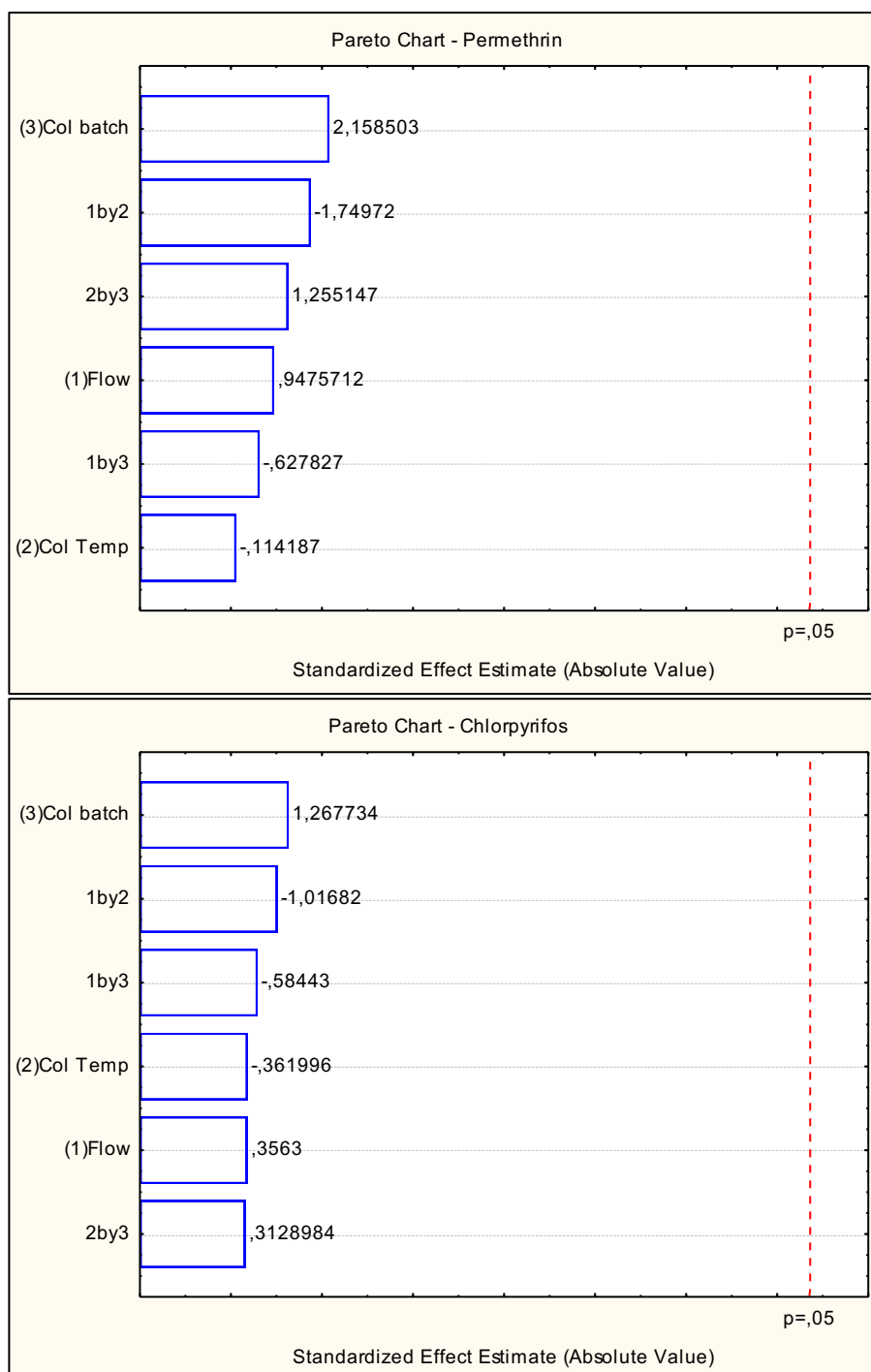


Figure S3. Pareto charts obtained from the analytical robustness test for the target insecticides ($p \leq 0.05$).

Figura S3. Gráficos de Pareto obtenidos de la prueba de robustez analítica para los insecticidas investigados ($p \leq 0.05$).

Table S1. Plackett-Burman design with the coded (and real) values for the eight sample preparation variables evaluated and recoveries results (%).

Tabla S1. Diseño de Plackett-Burman con los valores codificados (y reales) de las ocho variables de preparación de muestras evaluadas y resultados de recuperación (%).

Trial	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	CLO	IMI	DIM	CPY	CYP	PER
1	1 (1.5)	-1(2)	1(25)	-1(250)	-1(125)	-1(125)	1(75)	1(8)	129	85	78	92	43	88
2	1 (1.5)	1(6)	-1(5)	1(750)	-1(125)	-1(125)	-1(0)	1(8)	106	77	73	88	122	102
3	-1 (0.5)	1(6)	1(25)	-1(250)	1(375)	-1(125)	-1(0)	-1(2)	106	79	72	84	38	75
4	1 (1.5)	-1(2)	1(25)	1(750)	-1(125)	1(375)	-1(0)	-1(2)	129	86	77	87	123	92
5	1 (1.5)	1(6)	-1(5)	1(750)	1(375)	-1(125)	1(75)	-1(2)	122	86	77	86	125	95
6	1 (1.5)	1(6)	1(25)	-1(250)	1(375)	1(375)	-1(0)	1(8)	112	84	77	87	45	87
7	-1 (0.5)	1(6)	1(25)	1(750)	-1(125)	1(375)	1(75)	-1(2)	118	78	73	84	36	73
8	-1 (0.5)	-1(2)	1(25)	1(750)	1(375)	-1(125)	1(75)	1(8)	138	94	81	94	42	81
9	-1 (0.5)	-1(2)	-1(5)	1(750)	1(375)	1(375)	-1(0)	1(8)	130	97	86	90	42	82
10	1 (1.5)	-1(2)	-1(5)	-1(250)	1(375)	1(375)	1(75)	-1(2)	134	91	84	87	44	78
11	-1 (0.5)	1(6)	-1(5)	-1(250)	-1(125)	1(375)	1(75)	1(8)	106	79	70	86	41	72
12	-1 (1.5)	-1(2)	-1(5)	-1(250)	-1(125)	-1(125)	-1(0)	-1(2)	120	87	76	91	37	81
CP	0 (1.0)	0(4)	0(15)	0(500)	0(250)	0(250)	0(37.5)	0(5)	119	81	74	84	40	79
CP	0 (1.0)	0(4)	0(15)	0(500)	0(250)	0(250)	0(37.5)	0(5)	115	87	77	93	50	82
CP	0 (1.0)	0(4)	0(15)	0(500)	0(250)	0(250)	0(37.5)	0(5)	114	82	72	87	44	85

X1: NaCl (g); X2: MgSO₄ (g); X3: vortex(min); X4: MgSO₄ (mg); X5: PSA (mg); X6: C18 (mg); X7: GCB (mg); X8: vortex(min) CP: central point CLO = Clothianidin; IMI = Imidacloprid; DIM = Dimethoate; CPY = Chlorpyrifos; CYP = Cypermethrin; PER = Permethrin.

Table S2. Experimental design matrix 2³ for analytical robustness test.**Tabla S2.** Matriz de diseño experimental 2³ para la prueba de robustez analítica.

Parameters	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Nominal
Mobile phase flow	mL min ⁻¹	± 0.1	0.5	0.7	0.6
Column temperature	°C	± 5	40	50	45
Column batch	-	-	Batch 1	Batch 2	Batch 1

Trial	Mobile phase flow	Column temperature	Column batch
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, com a necessidade de aumento da produção agrícola, o uso de agrotóxicos tem se intensificado no Brasil. A preocupação com o manejo dos agrotóxicos está relacionada tanto à segurança dos alimentos como aos danos causados ao meio ambiente. Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção e quantificação de resíduos desses contaminantes é indispensável para o fornecimento de dados para futuras políticas de Boas Práticas Agrícolas e Apícolas.

A determinação multirresíduos em ceras de abelhas e o cálculo do quociente de risco de exposição trazem a luz uma preocupação referente ao grau de exposição da abelha dentro da colmeia. Sabe-se que a cera de abelha é comumente reciclada pelos apicultores para a manutenção da colmeia e resíduos de agrotóxicos apolares podem estar presentes nas mesmas (BOGDANOV, 2009; SANCHEZ-BAYO & GOKA, 2014). Assim, a abelha durante o estágio inicial de vida entra em contato com esses resíduos estocados na cera. O propósito deste estudo foi, através do método analítico estabelecido utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS), avaliar 19 amostras de ceras brasileiras e a partir dos dados obtidos delinear o cálculo do quociente de risco ao qual as abelhas estão expostas. Para tanto, utilizou-se de método multirresíduos empregando a GC-MS/MS 160 agrotóxicos e metabólitos foram analisados. Foi utilizado método QuEChERS modificado como técnica de preparo de amostra. O cálculo do quociente de risco foi realizado com base nos valores de referência de dose letal LD₅₀ por contato estabelecido para abelhas. Foi detectada presença de agrotóxicos acumulados na matriz, sendo os mesmos utilizados como inseticidas. Os *scores* calculados indicaram relevante toxicidade para abelhas em 5 amostras, sendo a permetrina e clorpirifós os maiores contribuintes para esse índice.

O glifosato (GLY), conforme estudos já relatados têm efeito crônico sobre a população de insetos polinizadores, principalmente abelhas melíferas (GILL *et al.*,

2018; HERBERT *et al.*, 2014). Para tanto, a determinação de GLY e seu metabólito AMPA em amostras de mel através da utilização de método específico utilizando o detector de fluorescência para quantificação mostrou-se adequada ao propósito inicial. Nesse estudo a utilização de um planejamento experimental 2^3 na etapa de otimização da reação de oxidação da molécula de glifosato e da reação pós-coluna (realizada com *o*-ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol) a fim de obtermos derivados fluorescentes, proporcionou maior rapidez na etapa de desenvolvimento, economia quanto ao uso de reagentes/solventes (número de experimentos reduzido) e gerou dados confiáveis estatisticamente para prosseguimento com a etapa de validação do método. A sensibilidade do método foi comprovada permitindo o monitoramento do glifosato e metabólito abaixo do limite máximo de resíduos (LMR) permitido para o mel ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), estabelecido como limite máximo aceitável pela Comunidade Europeia. O herbicida glifosato está em primeiro lugar dentre os agrotóxicos comercializados no Brasil e, como consequência de seu uso em diversos cultivos foi constatada sua presença em amostras de mel analisadas, inclusive acima do LMR estabelecido (amostras com até $220 \mu\text{g kg}^{-1}$).

A determinação de inseticidas em amostras de mel utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas aplicou-se à análise de permetrina, cipermetrina, dimetoato, clotianidina, imidacloprido e clorpirifós. Embora os piretroides (permetrina e cipermetrina) apresentem características físico-químicas que os tornam propensos à análise por cromatografia gasosa, nesse estudo não foi um fator limitante para quantificá-los em níveis de seus LMR's. O preparo de amostra é etapa fundamental no desenvolvimento do método. O delineamento de variáveis através da abordagem Plackett Burman foi aplicado ao método QuEChERS desenvolvido por ANASTASSIADES *et al.* (2003). A otimização da quantidade de MgSO_4 e NaCl na

etapa de partição proporcionou eficiência no efeito desejado de *salting out*. Na etapa de limpeza, a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) utilizando as quantidades ideais de C18 na remoção de pigmentos e PSA na remoção de açúcares e ácidos orgânicos diminuíram consideravelmente o efeito matriz na fonte do espectrômetro de massas. O método analítico foi validado e aplicado em 51 amostras de mel obtidas no Brasil e no exterior. A co-ocorrência de resíduos dos inseticidas estudados foi detectada em níveis abaixo do LOQ estabelecido para cada analito. Em apenas uma amostra foi detectado nível de cipermetrina acima do LMR estabelecido pelo MAPA no PNCRC/Mel (nível de contaminação em $102 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Os estudos aqui relatados trazem dados recentes e inéditos à literatura sobre a contaminação do mel pelo herbicida glifosato no Brasil, contribuem para o fornecimento de dados sobre o nível de contaminação das ceras de abelhas e o risco associado à saúde das abelhas e, ainda, apresentam novas informações sobre inseticidas presentes em amostras de mel através de análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Demonstram ainda a importância e necessidade em realizar estudos de monitoramento nas matrizes apícolas para a determinação de contaminações por agrotóxicos.

CONCLUSÃO GERAL

Com base nos dados apresentados, é possível concluir que os métodos analíticos desenvolvidos e validados para análise de mel de abelhas demonstraram adequação ao propósito de quantificar resíduos de agrotóxicos através de diferentes técnicas cromatográficas (LC MS/MS e LC-FLD). As amostras analisadas por ambos os métodos apresentaram a presença de resíduos de agrotóxicos, sendo que os LMR's foram ultrapassados para o herbicida glifosato (6 amostras) e para o inseticida cipermetrina (1 amostra). A partir dos dados obtidos em ceras de abelhas através de CG MS/MS e do cálculo do quociente de risco chega-se a conclusão de que o meio ambiente vem sendo contaminado sistematicamente por resíduos de agrotóxicos, colocando em risco a saúde das abelhas e a segurança e seguridade dos alimentos.

REFERÊNCIAS

ABADIO FINCO, D.B., MOURA, L.L., & SILVA, I.G. (2010). Physical and chemical properties of *Apis mellifera* L honey. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3),706–712. DOI 10.1590/S0101-20612010000300022.

ABEMEL. (2018). Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. Setor apícola brasileiro em números. <https://www.brazilletsbee.com.br/INTELIG%C3%84NCIA%20COMERCIAL%20ABEMEL%20-%20JANEIRO2018.pdf>.

AGROFIT. (2020). Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários [Phytosanitary Pesticide Systems]. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

AGUILERA-LUIZ, M. M., PLAZA-BOLAÑOS, P., ROMERO-GONZÁLEZ, R., VIDAL, J. L. M., FRENICH, A. G. (2011). Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2863-2875. DOI 10.1007/s00216-011-4670-7.

ALFERNESS, P.L., WIEBE, L.A. (2001). Determination by glyphosate and aminomethylphosphonic acid in crops by capillary gas chromatography with mass-selective detection: collaborative study. *Journal of the AOAC International*, 84(3), 823-846. DOI 10.1093/jaoac/84.3.823.

ALMEIDA, D., MARCHINI, L.C., SODRÉ, G. S., D'AVILA, M., ARRUDA, C.M.F. (2003). *Plantas visitadas por abelhas e polinização*. Piracicaba: Esalq, 40p.ISBN 1414-4530.

AL NAGGAR, Y., CODLING, G., VOGT, A., NAIEM, E., MONA, M., SEIF, A., GIESY, J.P. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 1–8. DOI 10.1016/j.ecoenv.2014.12.039.

ANASTASSIADES, M., KOLBERG, D.I., EICHORN E. WACHTLER, A.K., BENKENSTEIN, A., ZECHMANN S., MACK, D., WILDGRUBE, C., BARTH, A., SIGALOV, I., GÖRLICH, S., DÖRK, D., CERCHIA, G. (2020). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and lc-ms/ms measurement food of plant origin (QuPpe-PO-Method) EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM). Disponível em < [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V11\(1\).pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPpe_PO_V11(1).pdf)>

ANASTASSIADES, M., PAYÁ, P., MACK, D., SIGALOVA, I., TASDELEN, B., OLIVA, J., BARBA, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(6), 1697–1714. DOI 10.1007/s00216-007-1610-7

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. DOI 10.1093/jaoac/86.2.412.

ANVISA. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 296, de 29 de julho de 2019*. Dispõe sobre as informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira. Disponível em <
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/%281%29RDC_296_2019_COM_P.pdf/3264ce69-979f-426d-b1da-b6d49f44fdcc> Acesso em 20/02/2020

ARISSETO-BRAGOTTO, A. P., FELTES, M.M.C., BLOCK, J.M. (2017). Food quality and safety progress in the Brazilian food and beverage industry: chemical hazards. *Food Quality and Safety*, 1, (2), 117–129. DOI 10.1093/fqsafe/fyx009

BALBINO, V.A., BINOTTO, E., SIQUEIRA, E.S. (2015). Apicultura e responsabilidade social: desafios da produção e dificuldades em adotar práticas social e ambientalmente responsáveis. *REAd | Porto Alegre – Edição 81 - Nº 2 – maio/agosto 2015* – p. 348-377. DOI 10.1590/1413-2311.0442013.44185.

BARGAÑSKA, B., OLKOWSKA, E., DYMERSKI, T., & NAMIEŚNIK, J. (2014). Determination of Pesticide Residues in Honey using the GC×GC-TOFMS Technique. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4, 1-5. DOI 10.4172/2155-9821.1000182.

BARGAÑSKA, Z., NAMIEŚNIK, J. (2010). Pesticides analysis of bee and bee products samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(3), 159-171. DOI 10.1080/10408347.2010.490484.

BENUSZAK, J., LAURENT, M., CHAUZAT, M.P. (2017). The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: Room for improvement in research. *Science of Total Environmental*, 587-588, 423–438. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.02.062.

BERNAL, J., BERNAL, J.L., MARTIN, M.T., NOZAL, M.J., ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRANAGA, M.R., & MARTÍNEZ, M.A. (2010). Development and validation of a liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. *Journal of Chromatography B*, 878(31), 3290–3296. DOI 10.1016/j.jchromb.2010.10.013.

BOGDANOV, S. (2004). Beeswax: quality issues today. *Bee World*, 85(3), 46-50. DOI 10.1080/0005772X.2004.11099623.

BOGDANOV, S. (2006). Contaminants in bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-8. DOI 10.1051/apido:2005043.

BOGDANOV, S. (2009). Beeswax: production, properties composition and control. In: S. Bogdanov (Ed.), *Beeswax book* (1-17). Bee Product Science Publishing.

BPBES. (2019). Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. [Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services] <https://www.bpb.es.net.br>

BRADBEAR, N. (2009). *Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products*. Roma: FAO.

BRASIL. (2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução normativa nº 5, de 23 de abril de 2019*. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2019. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/>> Acesso em 30/06/2019.

BRASIL. (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2000). *Instrução Normativa nº 11, 20 de outubro de 2000*. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>>. Acesso em 18/08/2019.

BRASIL. (1996). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996*. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.html> Acesso em 20/02/2020.

BRASIL. (1992). Ministério da Saúde. *Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992*. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1992/prt0003_16_01_1992.html> Acesso em 20/02/2020.

BRASIL. (1989). Presidência da República. *Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989*. Disponível em <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=7802&ano=1989&ato=501MTR61EeFpWT452>> Acesso em 18/06/2019.

BREED, M.D. (2010). Honeybees. In: M. D. Breed & J. Moore. (Eds.), *Encyclopedia of animal behavior* (89-96). Elsevier.

BRUCKNER, S., STEINHAEUER, N., RENNICH, K., AURELL, S.D., CARON, D.M., ELLIS, J.D., FAUVEL, A.M., KULHANEK, K., NELSON, K.C., RANGEL, J., ROSE, R. (2018). Honey bee colony losses 2017–2018: preliminary results. Bee Informed Partnership. <https://beeinformed.org/wp-content/uploads/2019/11/2017-2018-Abstract.pdf>.

BOVI, T.S. *Toxicidade de inseticidas para abelhas Apis melífera L.* 2013 69f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

CABRERA, L.C., MARTINS, M.L., PRIMEL, E.G., PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. (2012). Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos *Scientia Chromatographica*, 4(3), 227-240 10.4322/sc.2012.013

- CALATAYUD-VERNICH, P., CALATAYUD, F., SIMÓ, E., & PICÓ, Y. (2017). Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Science of the Total Environment*, 605-606, 745-754. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.06.174.
- CALATAYUD-VERNICH, P., CALATAYUD, F., SIMÓ, E., PICÓ, Y. (2018). Pesticide residue in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*, 241, 106-114. DOI 10.1016/j.envpol.2018.05.062.
- CASTILHOS, D., BERGAMO, G.C., GRAMACHO, K.P., GONÇALVES, L.S. (2019). Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 50, 263-272. DOI 10.1007/s13592-019-00642-7.
- CASTILHOS, D., DOMBROSKI, J. L. D., BERGAMO, G. C., GRAMACHO, K. P., & GONÇALVES, L. S. (2019b). Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. *Apidologie*, 50(5), 657–668. DOI 10.1007/s13592-019-00676-x.
- CHIESA, L.M., NOBILE, M., PANSERI, S., ARIOLI, F. (2019). Detection of glyphosate and its metabolites in food of animal origin based on ion-chromatography-high resolution mass spectrometry (IC-HRMS). *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36(4), 592-600. DOI 10.1080/19440049.2019.1583380.
- CHRISTODOULOU, D.L., KANARI, P., KOUROUZIDOU, O., CONSTANTINOU, M., HADJILOIZOU, P., KIKI, K., CONSTANTINOU, P. (2015). Pesticide residues analysis in honey using ethyl acetate extraction method: validation and pilot survey in real samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(10), 894-910. DOI 10.1080/03067319.2015.1070408.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2019). International Food Standards. Standard for Honey Codex Stan CXS 12-1981. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2016). *Definition pesticides*. Disponível em <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pesticide-mrls/en/>>. Acesso em 24/02/2016.
- CODLING, G., AL NAGGAR, Y., GIESY, J.P., ROBERTSON, A.J. (2016). Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere*, 144, 2321-2328. DOI 10.1016/j.chemosphere.2015.10.135.
- COLMEIA VIVA. (2017). *Colmeia Viva 2017*. Disponível em <<https://www.colmeiaviva.com.br/>> . Acesso em 20/11/2019.
- COLOSS. (2020). Honey bee research association. Disponível em <https://coloss.org>
- COLOMBO, S.M., MASINI, J.C. (2011). Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study a desorption of glyphosate on soil and sediment samples. *Microchemical Journal*, 98(2), 260-266. DOI 10.1016/j.microc.2011.02.009.

COWELL, J.E., KUNSTMAN, J.L., NORD, P.J., STEINMETZ, J.R., WILSON, G.R. (1986). Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(6), 955-960. DOI 10.1021/jf00072a006.

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J. (2010). Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. In: S. Thany (Ed), *Insect nicotinic acetylcholine receptors* (pp 85-95). Springer.

DOS SANTOS, C.F., OTESBELGUE, A., BLOCHTEIN, B. (2018). The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS ONE*, 13(7), e0200286. DOI 10.1371/journal.pone.0200286.

DUKE, S.O., POWLES, S.B. (2008). Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(December 2008), 319–325. DOI 10.1002/ps.1518.

EC. (2013). European Comission. *Official Journal of the European Communities* 25/05/2013, L 139/12.

EC. (2005). European Community Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/ EEC, Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R0396-20200518>.

EC. (2002). European Community. Commission Decision 2002/ 657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Commun L. 221:8–36. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>.

EFSA. (2007). European Food Safety Authority. Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission on the safety in use of beeswax. *EFSA Journal*, 615, 1-28. Disponível em <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2007.615> Acesso em 26/03/2020

EFSA. (2013). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal*, 11(1), 3066, 58 pp. DOI 10.2903/j.efsa.2013.3066.

EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11), 4302, DOI 10.2903/j.efsa.2015.4302.

EFSA. (2018). European Food Safety Authority. *Neonicotinoids: risks to bees confirmed*.

Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228>> Acesso em 20/02/2020.

EFSA. (2018). European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal*, 16(2), 5178, 113 pp. DOI 10.2903/j.efsa.2018.5178.

EFSA. (2020). European Food Safety Authority. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 18(4), 6057, 103 pp. DOI 10.2903/j.efsa.2020.6057.

EMBRAPA. (2006). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Mel*: características e propriedades. 28p.

EMBRAPA. (2010). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. O desaparecimento das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e as perspectivas do uso de abelhas não melíferas na polinização. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69296/1/Abelha.pdf>.

EMBRAPA. (2019). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja em números (safra 2018/19). <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>.

EPA. (1993). Environmental Protection Agency. Registration Eligibility Decision (RED) for Glyphosate – EPA. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>.

EPA. (2013). Environmental Protection Agency. 40 CFR Part 180 [EPA–HQ–OPP–2012–0132; FRL–9384–3]. Glyphosate; Pesticide Tolerances. Federal Register 78(84), 25396 – 25401. May 1, 2013, Rules and Regulations. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2013-05-01/pdf/2013-10316.pdf>.

EPAGRI. (2020). Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina. Disponível em <https://ciram.epagri.sc.gov.br/apicultura/apresentacao.html>

ERENO, D. (2014). Abelhas vigiadas. *Revista Pesquisa Fapesp*, 221, 70-73. <https://revistapesquisa.fapesp.br/abelhas-vigiadas/>.

EUROPEAN DATA BASE. (2019). Maximum Limits Residue Levels. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en.

FAO. (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations International Food Standards. Pesticides Database. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=158.

FAO. (2020). Food Agriculture Organization. *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)*. Disponível em

<https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jmpr/en> Acesso em 20/02/2020.

FAO. (2019). Food Agriculture Organization. *TECA - Technologies and Practices for Small Agricultural Producers*. Disponível em <<http://www.fao.org/teca/categories/beekeeping/en/>>. Acesso em 20/11/2019.

FAO. (2017). Food Agriculture Organization in Brazil <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/901168/>.

FAOSTAT. (2020). Food Agriculture Organization. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>> Acesso em 20/02/2020.

FARAJZADEH, M.A., MOGADDAN, M.R.A., GHORBANPOUR, H. (2014). Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1347, 8-16. DOI 10.1016/j.chroma.2014.04.067.

FOOD SAFETY. (2018). *Mel*: com mercado aquecido, o mundo se preocupa cada vez mais com fraudes. Disponível em <<https://foodsafetybrazil.org/mel-com-mercado-aquecido-o-mundo-se-preocupa-com-cada-vez-mais-fraudes/>> Acesso em 20/11/2019.

FRATINI, F., CILIA, G., TURCHI, B., FELICOLI, A. (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, (9), 839-843. DOI 10.1016/j.apjtm.2016.07.003.

FREITAS, B.M., PINHEIRO, J.N. (2010). Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, 14(1), 266-281. DOI 10.4257/oeco.2010.1401.16.

GALLEGOS, C.E., BARTOS, M., BRAS, C., GUMILAR, F., ANTONELLI, M.C., MINETTI, A. (2016). Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. *NeuroToxicology*, 53, 20-28. DOI 10.1016/j.neuro.2015.11.015.

GARCÍA, M.D.G., DUQUE, S.U., LOZANO, A.B., SOSA, A., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. (2017). Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. *Talanta* 163, 54-64. DOI 10.1016/j.talanta.2016.10.083.

GAWEL, M., KILJANEK, T., NIEWIADOWSKA, A., SEMENIUK, S., GOLISZEK, M., BUREK, O., POSYNIK, A. (2019). Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 282, 36-47. DOI 10.1016/j.foodchem.2019.01.003.

GBYLIK-SIKORSKA, M., SNIEGOCKI, T., POSYNIK, A. (2015). Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honeybee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 990, 132-140. DOI 10.1016/j.jchromb.2015.03.016.

- GIANNINI, T.C., CORDEIRO, G.D., FREITAS, B.M., SAIRAUVA, A.M.M IMPERATIRZ-FONSECA, V.L. (2015). The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *Journal of Economy and Entomology*, 108(3), 849–857. DOI 10.1093/jee/tov093.
- GILL, J.P.K., SETHI, N., MOHAN, A., DATTA, S., GIRDHAR, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16, 401-4026. DOI 10.1007/s10311-017-0689-0.
- GIROUD, B., VAUCHEZ, A., VULLIET, E., WIEST, L., BULETÉ, A. (2013). Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316, 53-61. DOI 10.1016/j.chroma.2013.09.088.
- GONÇALVES, L.S., CASTILHOS, D. (2015). Application of the electronic device "BEE ALERT" for registering death of honeybees, stingless bees in general and disappearance of honey bees (CCD) in Brazil. In: International Apicultural Congress, 44. Daejeon, Korea. Scientific Program Abstracts. Daejeon: Apimondia, p.
- GONÇALVES, L.S. (2014) O uso dos pesticidas sistêmicos no combate às pragas e seus reflexos nas abelhas: campanha de proteção às abelhas e o aplicativo Bee Alert. In: Libro de Resúmenes del XI Congreso Latinoamericano de Apicultura, 2014-FILAPI. Puerto Iguazu-Misiones, Argentina, 03 a 06 de setembro 2014, p.152013-2017
- GONÇALVES, L.S. (2012a) O Desaparecimento das abelhas, suas causas, consequências e o risco dos Neonicotinóides para o Agronegócio. Mensagem Doce, 117, 2–12. Disponível em <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/117/artigo1.htm>.
- GONÇALVES, L.S. (2012b) Consequências do Desaparecimento (CCD) das Abelhas no Agronegócio Apícola Internacional e em especial no Brasil. In: Anais do Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto, 10.
- GONZÁLEZ-CURBELO, M.A., SOCAS-RODRÍGUEZ, B., HERRERA-HERRERA, A.V., GONZÁLEZ-SÁLAMO, J., HERNÁNDEZ-BORGES, J., & RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185. DOI 10.1016/j.trac.2015.04.012.
- GOSCINNY, S., UNTERLUGGAUER, H., ALDRIAN, J., HANOT, V., MASSETER, S. (2012). Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 5, 1177-1185. DOI 10.1007/s12161-011-9361-7.
- GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTIAS, C., ROTHERAY, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957. DOI 10.1126/science.1255957.
- GRAY, A., BRODSCHNEIDER, R., ADJLANE, N., BALLIS, A., BRUSBARDIS, V., CHARRIÈRE, J.D., CHLEBO, R., COFFEY, M.F., CORNELISSEN, B., COSTA, C.A., CSÁKI, T., DAHLE, B., DANIHLÍK, J., et al. (2019). Loss rates of honey bee

colonies during winter 2017/2018 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal Apicultural Research*, 58(4), 479–85. DOI 10.1080/00218839.2019.1615661.

HARRIET, J., CAMPÁ, J.P., GRAJALES, M., LHÉRITIER, C., PAJUELO, A.G., MENDOZA-SPINA, Y., CARRASCO-LETELIER, L. (2017). Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax. *Chemosphere*, 177, 77-83. DOI 10.1016/j.chemosphere.2017.02.131.

HASHIMOTO, J. C., QUEIROZ, S.C.N., FERRACINI, V.L., ASSALIN, M.R., REYES, F.G.R. (2012). A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified QuEChERS extraction and LC MS/MS. *Journal of AOAC International*, 95 (3), 913-922. DOI 10.5740/jaoacint.11-140.

HERBERT, L.T., VAÂZQUEZ, D.E., ARENAS, A., FARINA, W.M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behavior. *The Journal of Experimental Biology*, 217, 3457-3464. DOI 10.1242/jeb.109520.

HERNANDEZ, F., HIDALGO, C., SANCHO, J. (2000). Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 83(3), 728-34. DOI 10.1093/jaoac/83.3.728.

IARC. (2015). International Agency for Research on Cancer Monographs. <https://www.iarc.fr>

IBAMA. (2017). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Disponível em <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/centrais-de-conteudo/2017-07-25-manual-ibama-ara-abelhas-in0217-web-pdf>>

IBAMA. (2018). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>.

IBGE. (2018). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php>.

IBGE. (2020). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Safra 2019. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/lspa/tabelas>> Acesso em 20/02/2020.

JAHNKE, B., FRANK, C., FERNÁNDEZ, J.F., NIEMEYER, B. (2014). A sequential injection analysis method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water samples. *American Chemical Science Journal*, 5(2), 163-173. DOI 10.9734/ACSJ/2015/13089.

JESCHKE, P., NAUEN, R. (2005). Neonicotinoid Insecticides. In: L.I. Gilbert, K. Iatrou, & S.S. Gill (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science* (pp. 53-105). Elsevier.

- JOVANOVIĆ, P., GUZSVÁNY, V., LAZIC, S., FRANKO, M., SAKAC, M., SARIC, L., & KOS, J. (2015). Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 106–113. DOI 10.1016/j.jfca.2014.12.021.
- KARAGEORGIOU, E., SAMANIDOU, V. (2014). Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography A*, 1353, 131–139. DOI 10.1016/j.chroma.2014.01.050.
- KASIOITIS, K.M., AGNOSTOPOULOS, C., ANASTASIADOU, P., MACHERA, K. (2014). Pesticides residues in honeybees, honey and bee pollen by LC MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment*, 485-486, 633-642. DOI 10.1016/j.scitotenv.2014.03.042.
- KILJANEK, T., NIEWIADOWSKA, A., SEMENIUK, S., GAWEL, M., BORZECKA, M., POSYNIAK, A. (2016). Multiresidue method for the determination of pesticides and pesticides metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry- Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A*, 1435, 100-114. DOI 10.1016/j.chroma.2016.01.045.
- KRELL, R. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Roma: FAO.
- KUJAWSKI, M., BARGANSKA, K., MARCINIAK K., et al. (2014). Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS - Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches. *LWT- Food Science and Technology*, 56 (2), 517-523. DOI 10.1016/j.lwt.2013.11.024.
- LACINA, O., ZACHARIASOVA, M., URBANOVA, J., VACLAVIKOVA, M., CAJKA, T., HAJŠLOVA, J. (2012). Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1262, 8-18. DOI 10.1016/j.chroma.2012.08.097.
- LEHOTAY, S.J. (2018). Food safety analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 5329–5330 DOI 10.1007/s00216-018-1129-0.
- LEHOTAY, S.J., COOK, J.M. (2015). Sampling and sample processing in pesticide residue analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4395-4404. DOI 10.1021/jf5056985.
- LEHOTAY, S.J., SON, K.A., KWON, H., KOESUKWIWAT, U., FU, W., MASTOVSKA, K., HOH, E., LEEPIPATPIBOON, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2548-2560. DOI 10.1016/j.chroma.2010.01.044.

LEHOTAY, S.J. & Collaborators. (2007). Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of AOAC* 90(2), 485–520, 10.1093/jaoac/90.2.485

LEHOTAY, S.J. & MASTOVSKA, K. (2005). Determination of pesticide residues. In: S. Otles (Ed.), *Methods of Analysis of Food Components and Additives* (pp. 329-359). CRC press.

LI, Y., KELLEY, R.A., ANDERSON, T.D., LYDY, M.J. (2015). Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honeybees, pollen, and wax by gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 140, 81–87. DOI 10.1016/j.talanta.2015.03.031.

LÓPEZ, D.R., AHUMADA, D.A., DÍAZ, A.C., GUERRERO, J.A. (2014). Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37, 33-40. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.09.011.

LUKE, M.A., FROBERG, J.E., MASUMOTO, H.T. (1975). Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gasliquid chromatography. *Journal of AOAC*, 58, 1020-1026.

MALHAT, F.M., HAGGAG, M.N., LOUTFY, N.M., OSMAN, M.A.M., AHMED, M.T. (2015). Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere*, 120, 457–461. DOI 10.1016/j.chemosphere.2014.08.032.

MAPA. (2020). Codex Alimentarius e a participação brasileira no Comitê de Resíduos de Pesticidas. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/hortalicas/anos-anteriores/codex-22.pdf/@download/file/codex-22.pdf> > Acesso em 20/11/2020.

MAPA. (2019). Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction 5 of April 23, 2019. National Plan for the Control of Residues and Contaminants in Animal Products - PNCRC of 2019. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/PNCRC2019SamplingPlan.pdf/view>.

MARTÍNEZ, M.A., ARES, I., RODRÍGUEZ, J.L., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRANAGA, M.R., ANADÓN, A. (2018). Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environmental Research*, 161, 212-219. DOI 10.1016/j.envres.2017.10.05.

MANNING R. (2018). Chemical residues in beebread, honey, pollen and wax samples collected from bee hives placed on canola crops in Western Australia. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 696–708. DOI 10.1080/00218839.2018.1494889.

MCBEAN, E.A., ROVERS, F.A. (1984). Alternatives for handling detection limit data in impact assessments. *Groundwater Monitoring & Remediation*, 4, 42-44. DOI 10.1111/j.1745-6592.1984.tb00881.x

MESSAGE, D. 2010. Principais problemas sanitários em apiários no Brasil. CCD (Colony Collapse Disorder) ou desaparecimento das abelhas, in: Congresso Iberolatinoamericano de Apicultura, 10. Natal. CD-ROM

MURADIAN, L.G., BERA, A. (2007). Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 49–52. DOI 10.1590/S0101-20612007000100009.

MULLIN, C.A., FRAZIER, M., FRAZIER, J.L., ASHCRAFT, S., SIMONDS, R., VANEGELSDORP, D., PETTIS, J.S. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*, 5(3), e9754. DOI 10.1371/journal.pone.0009754.

NEGRI, G., MARCUCCI, M.C., SALATINO, A., SALATINO, M.L.F. (2000) Comb and propolis waxes from Brazil: triterpenoids in propolis waxes. *Journal of Apicultural Research*, 39 (1-2), 86-88. DOI: 10.1080/00218839.2000.11101026

NIELL, S., CESIO, V., HEPPERLE, J., DOERK, D., KIRSCH, L., KOLBERG, D., SCHERBAUM, E., ANASTASSIADES, M., HEIZEN, H. (2014). QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticide in beeswax by LC-MS/MS and GC x GC-TOF. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(17), 3675-3683. DOI 10.1021/jf405771t.

NOVAIS, S.M.A., NUNES, C.A., SANTOS, N.B., DÁMICO, A.R., FERNANDES, G.W., QUESADA, M., BRAGA, R.F., NEVES, A.C.O. (2016). Effects of a possible pollinator crisis on food crop production in Brazil. *PLoS ONE*, 11(11), e0167292. DOI 10.1371/journal.pone.0167292.

ORANTES-BERMEJO, F.J., PAJUELO, A.G., MEGÍAS, M.M., FERNÁNDEZ-PÍÑAR, C.T. (2010). Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, 49, 243–250. DOI 10.3896/IBRA.1.49.3.03.

ORTEGA, P. P.; LÓPEZ, B. G.; REYES, J. F. G.; MARTOS, N. R.; DÍAZ, A. M. (2012). Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1249, 32-40. DOI 0.1016/j.chroma.2012.06.020.

ORSO, D., FLORIANO, L., RIBEIRO, L.C., BANDEIRA, N.M., PRESTES, O.D., ZANELLA, R. (2015). Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9, 1638-1653. DOI 10.1007/s12161-015-0339-8.

ORSO D, MARTINS ML, DONATO FF, RIZZETTI TM, KEMMERICH, M., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. (2014). Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(8), 1355-1364. DOI 10.1007/s12161-015-0339-8.

OSÉS, S.M., PASCUAL-MATÉ, A., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A., LÓPEZ-DÍAZ, T.M., SANCHO, M.T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215–1223. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.10.050.

PANSERI, S., CHIESA, L.M., CATALANO, A., GIORGI, A. et al. (2014). Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*, 38, 150-156. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.10.024.

PAREJA, L., JESÚS, F., HEIZEN, H., HERNANDO, M.D., RAJSKI, L., FERNANDEZ-ALBA, A.R. (2019). Evaluation of glyphosate and AMPA in honey by water extraction followed by ion chromatography mass spectrometry. A pilot monitoring study. *Analytical Methods*, 11, 2123-2128. DOI 10.1039/c9ay00543.

PERES, F., MOREIRA, J. C., DUNOIS, G. S. (2003). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PERUGINI, M., TULINI, S.M.R., ZEZZA, D., FENUCCI, S., CONTE, A., AMORENA, M. (2018). Occurrence of agrochemical residues in beeswax samples collected in Italy during 2013–2015. *Science of the Total Environment*, 625, 470–476. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.12.321.

PINHEIRO, J.N., FREITAS, B.M. (2010). Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros [Lethal effects of agricultural pesticides on pollinators and management perspectives for Brazilian agroecosystems]. *Oecologia Australis*, 14(1), 266-281. DOI 10.4257/oeco.2010.1401.16.

PINTO, C.T., PANKOWSKI, J. A., NANO, F.E. (2017). The anti-microbial effect of food wrap containing beeswax products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7, 2017, 145-148. DOI 10.15414/jmbfs.2017.7.2.145-148.

PIRES, C.S.S., PEREIRA, F.M., LOPES, M.T.R., NOCELLI, R.C.F., MALASPINA, O., PETTIS, J.S., TEIXEIRA, E.W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? *Pesquisa. Agropecuária Brasileira*, 51 (5), 422–442. DOI 10.1590/S0100-204 X2016000500003

PRESTES, O.D, ADAIME, M.B., ZANELLA, R. (2011). QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 51-64. DOI 10.4322/sc.2011.004

PRESTES, O. D., FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. (2009). QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, 32 (6), 1620-1634. DOI 10.1590/S0100-40422009000600046.

PubChem. (2020). Open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- RAVOET, J., REYBROECK, W., DE GRAAF, D.C. (2015). Pesticides for Apicultural and/or Agricultural Application Found in Belgian Honey Bee Wax Combs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(5), 543-548. DOI 10.1007/s00128-015-1511-y.
- REJCZAK, T., TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 13, 2015, 980-1010. DOI 10.1515/chem-2015-0109.
- RISSATO, S.R., GALHIANE, M.S., ALMEIDA, M.V., GERENUTTI, M., APON, B.M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry* 101, 1719-1726. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.10.034.
- RODRIGUES, N.R., SOUZA, A.P.F. (2018). Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35(4), 723-730. DOI 10.1080/19440049.2017.1419286.
- ROY, N.M., CARNEIRO, B., OCHS, J. (2016). Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 45-54. DOI 10.1016/j.etap.2016.01.003.
- RUBIO, F., GUO, E., KAMP, L. (2014). Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 5(1), 249-257. DOI 10.4172/2161-0525.1000249.
- SANCHEZ-BAYO, F., GOKA, K. (2014). Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLoS ONE*, 9(4), e94482. DOI 10.1371/journal.pone.0094482.
- SANCHEZ-BAYO, F., GOKA, K. (2016). Impacts of Pesticides on Honey Bees. In: E. Chambo (Ed.), *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research* (pp. 77-97). IntechOpen.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L., HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, D., MARTÍN, M.T., NOZAL, M.J., HIGES, M., YAGUE, J.L.B. (2016). Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *Journal of Chromatography A*, 1428, 220–227. DOI 10.1016/j.chroma.2015.10.066.
- SANTE. (2018). Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides. Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/11813/2017). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.
- SANTOS, V.M.R., DONNICI, C.L., DACOSTA, J.B.N., CAIXEIRO, J.M.R. (2007). Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais [Pentavalent organophosphate compounds: history, synthetic methods of preparation and applications such as

insecticides and anti-tumor agentes]. *Química Nova*, 30(1), 159-170. DOI 10.1590/S0100-40422007000100028.

Santos, M.A.T., Areas, M.A., Reyes, F.G.R. (2007). Piretróides – uma visão geral [Pyrethroids – an overview]. *Alimentos & Nutrição*, 18(3), 339–349.

SAPOZHNIKOVA, Y., LEHOTAY, S.J. (2013). Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 758, 80-92. DOI 10.1016/j.aca.2012.10.034.

SHENDY, A.H., AL-GHOBASHY, M.A., ALLA, S.A.G., LOTFY, H.M. (2016). Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. *Food Chemistry*, 190, 982-989. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.06.048.

SILVA, V., MONTANARELLA, L., JONES, A., FERNÁNDEZ-UGALDE, O., MOL, H.G.J., RITSEMA, C.J., GEISSEN, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of Total Environmental*, 621, 1352-1359. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.10.093.

SILVA, P.M., GAUCHE, C., GONZAGA, L.V., COSTA, A.C.O., FETT, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.09.051.

SILVA, R.A., MAIA, G.A., SOUSA, P.H.M., COSTA, J.M.C. (2006). Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. *Alimentos e Nutrição*, 17 (1), 113-120.

SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., BONMATIN, J. M., CHAGNON, M., DOWNS, C., FURLAN, L., GIBBONS, D. W., GIORIO, C., GIROLAMI, V., GOULSON, D., et al. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1), 5–34. DOI 10.1007/s11356-014-3470-y.

TAPPARO, A., GIORIO, C., SOLDÀ, L., BOGIALLI, S., MARTON, D., MARZARO, M., GIROLAMI, V. (2013). UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Anal Bioanal Chem*, 405, 1007–1014. DOI 10.1007/s00216-012-6338-3.

TETTE, P.A.S., GUIDI, L., GLÓRIA, M.B.A., FERNANDES, C. (2016a). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta*, 149, 124-141. DOI 10.1016/j.talanta.2015.11.045.

TETTE, P.A., OLIVEIRA, F.A., PEREIRA, E.N., SILVA, G., GLÓRIA, M.B., FERNANDES, C. (2016b). Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 211, 130-139. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.05.036.

THOMPSON, T.S., VAN DER HEEVER, J.P., LIMANOWKA, R.E. (2019). Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 36(3), 434-446. DOI 10.1080/19440049.2019.1577993

TOMASINI, D. S., MAICON, R.F., CALDAS, S.S., BUFFON, J.G., DUARTE, F.A., PRIMEL, E.G. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99, 380–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012>

USDA. (2020a). ARS Honey Bee Health. Disponível em <https://www.ars.usda.gov/oc/br/ccd/index/#reports>

USDA. (2020b). Honey Bee Colonies. Disponível em <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/rn301137d?locale=en>

USDA. (2015). United States Department of Agriculture. Bee **Survey: Lower Winter Losses, Higher Summer Losses, Increased Total Annual Losses.** [<https://www.ars.usda.gov/news-events/news/research-news/2015/bee-survey-lower-winter-losses-higher-summer-losses-increased-total-annual-losses>].

VALDOVINOS-FLORES, C., ALCANTAR-ROSALES, V.M., GASPAR-RAMIREZ, O., SALDAÑA-LOZA, L.M., DORANTE-UGALDE, J. (2017). Agricultural pesticide residues in honey and wax combs from Southeastern, Central and Northeastern Mexico. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 667-679. DOI 10.1080/00218839.2017.1340798.

WILLIAMS, G.R., TROXLER, A., RETSCHINIG, G., ROTH, K., YANEZ, O., SHUTLER, D., NEUMANN, P., GAUTHIER, L. (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honeybee queens. *Scientific Reports*, 5, 14621. DOI 10.1038/srep14621.

ZHANG, J. M.; WU, Y. L.; YAO-BIN LU, Y. B. (2013). Simultaneous determination of carbamate insecticides and mycotoxins in cereals by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure. *Journal of Chromatography B*, 915-916, 13-20. DOI 10.1016/j.jchromb.2012.

ZOLLER, O., RHYN, P., RUPP, H., ZARN, J.A., GEISER, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 11(2), 83-91. DOI 10.1080/19393210.2017.1419509

ANEXO I. APLICAÇÃO DE MÉTODO MULTIRESSÍDUOS PARA ANÁLISES DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS EM AMOSTRAS DE MEL DO MERCADO BRASILEIRO

1. Método utilizado

O método utilizado neste trabalho foi desenvolvido e validado por Garcia et al. (2017) no Laboratório Europeu de Referência em Frutas e Hortaliças – EURL-FV localizado na Universidade de Almería, em Almería, Espanha - e contempla a análise de 160 compostos e seus metabólitos através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O limite de quantificação do método (LOQ) é de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos, com exceção de 3,5-dicloroanilina e clordano que é de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. A aplicação desse método em amostras de mel provenientes do Brasil foi realizada no laboratório EURL-FV durante o período de estágio doutoral.

1.1 Solventes, reagentes e padrões

Todos os padrões de agrotóxicos de alta pureza (pureza superior a 98%) foram obtidos da LGC (Teddington, Reino Unido), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) ou Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha) e armazenados a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetato de etila com grau de pureza espectrometria de massa (MS) foram adquiridos na Fluka Analytical (Steinheim, Alemanha). Formiato de amônio, ácido fórmico, sulfato de magnésio anidro (MgSO_4), cloreto de sódio (NaCl), hidrogenocitrato dissódico sesqui-hidratado ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Na}_4\text{O}_{17}$) e citrato tribásico de sódio di-hidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Sigma – Aldrich (Steinheim, Alemanha). O sorvente PSA foi fornecido pela Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Água ultra-purificada foi obtida de um sistema de água Milli-Q (Massachusetts, EUA) com uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

1.2 Preparo de soluções estoque e trabalho

As soluções estoque ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos padrões analíticos foram preparados em ACN. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas a

-30 °C. As soluções de trabalho foram preparadas em ACN em concentrações variadas, a partir das soluções estoque e refeitas a cada dia. Para obtenção da curva analítica os padrões correspondentes foram secos (50 µL) em vial âmbar com auxílio de N₂ e resuspendidos em acetato de etila (50 µL).

1.3 Sistema GC- MS/MS

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo de gás Agilent Technologies Intuvo 9000 (Palo Alto, CA, EUA), equipado com um amostrador automático 7693, injetor *split / splitless* e detector de espectrometria de massa triplo quadrupolo. A separação cromatográfica foi obtida em duas colunas planares HP-5MS (15 m x 0,25 mm ID x 0,25 mm de espessura de filme, Agilent, EUA) e um *guard chip* como a pré-coluna. O programa de temperatura do forno foi: temperatura inicial de 60 °C mantida por 0,5 min, aumentada para 170 °C a uma taxa de 40 °C min⁻¹ e depois aumentada para 310 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹ mais 2 min de equilíbrio. O tempo total de execução da análise cromatográfica foi de 12,4 min. O programa do injetor foi ajustado para 80 °C, mantido por 0,1 min e posteriormente aumentado para 300 °C a uma taxa de 60 °C min⁻¹. O gás de arraste foi o hélio com taxas de fluxo constantes de 1,3 mL min⁻¹ para a coluna 1 e 1,5 mL min⁻¹ para a coluna 2. O volume de injeção foi de 2 µL no modo *splitless*. O sistema MS/MS com fonte de íons de alta eficiência (HES) de ionização de elétrons (EI) foi utilizado para a análise por espectrometria de massa. As temperaturas da linha de transferência, fonte de íons e quadrupolo 1 e 2 foram 280 °C, 280 °C e 150 °C, respectivamente.

1.4 Preparo das amostras de mel

Foram realizadas análises em 18 amostras de mel provenientes do mercado brasileiro. Cada amostra homogeneizada (10,0 g) foi pesada em um tubo de centrifuga de politetrafluoroetileno (PTFE) de 50 mL. Em seguida, 10,0 mL de água e 10,0 mL de ACN foram adicionados ao tubo, e a mistura foi agitada em um extrator axial automático por 4 min. Em seguida, MgSO₄ (4,0 g), NaCl (1,0 g), Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (1,0 g) e C₁₂H₁₈Na₄O₁₇ (0,5 g) foram adicionados aos tubos, e as misturas foram agitadas no extrator axial automático por 5 min a uma temperatura constante de 40 °C e depois centrifugado (RCF 2.500 g) durante 5 min. Uma alíquota de 5,0 mL do sobrenadante foi

transferida para um tubo de centrífuga de PTFE de 15 mL que continha MgSO_4 (750 mg) e PSA (125 mg). As amostras foram agitadas em vórtice por 30 s e centrifugadas novamente (RCF 2.500 g) por 5 min. Os extratos foram transferidos para um frasco âmbar e acidificados com 10 μL por mL de extrato com uma solução de acetonitrila com ácido fórmico a 5%. Uma alíquota de 100 μL foi transferida para um frasco âmbar e evaporada sob um fluxo suave de N_2 ; em seguida, o extrato seco foi ressuspensão com acetato de etila e levado para injeção

1.5 Controle de Qualidade

O padrão interno (IS) trifenilfosfato (TPP) e diclorvós-*d6* foram adicionados à amostra a uma concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ antes do procedimento de extração para registrar as possíveis perdas que ocorreram durante a preparação da amostra e análise por GC - MS/MS. O IS lindano-*d6* foi adicionado ao extrato final a 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ antes da injeção do GC como um controle de qualidade para o sistema GC-MS/MS.

Para a identificação e quantificação de possíveis resíduos foram utilizados os critérios estabelecidos na diretriz SANTE 11813/2017 (SANTE, 2018). Os requisitos incluem: a detecção de duas transições sobrepostas com a mesma forma de pico e uma relação sinal-ruído acima de 3; uma tolerância de tempo de retenção de $\pm 0,1$ min em comparação com o padrão no solvente; uma conformidade de razão de íons (SRM2/SRM1) de $\pm 30\%$ da média dos padrões da mesma sequência.

2. Resultados

O controle de qualidade demonstrou a aplicabilidade do método e a eficiência da extração dos compostos. As recuperações obtidas para TPP e diclorvós-*d6* após o procedimento de extração e análise por GC-MS/MS foram respectivamente, 82% e 84%, com coeficientes de variação respectivamente, 16% e 18%. Já para o padrão de controle de injeção lindano-*d6*, a variação de área em cada injeção de amostra não ultrapassou 9%. Todos os critérios de aceitabilidade preconizados pela diretiva SANTE (2018) foram atendidos.

Nas análises das 18 amostras de mel não foi verificada a presença de resíduos de agrotóxicos.

3. Conclusão

A avaliação de amostras de mel do Brasil realizadas através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas não detectou a presença de resíduos de agrotóxicos dentro do escopo do método utilizado. Um número maior de amostras deverá ser analisado a fim de concluir realmente se o mel brasileiro disponível no mercado está isento de resíduos de agrotóxicos.